

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Anorganická chemie



**Bc. Tereza Krchová**

MRI kontrastní látky využívající přenosu saturace  
MRI Contrast Agents Based on Saturation Transfer

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha, 2012

Tato práce byla financována z grantu GAČR P207/11/1437.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2012

Podpis

Název: MRI kontrastní látky využívající přenosu saturace

Řešitel: Bc. Tereza Krchová

Ústav: Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Školitel: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

E-mail školitele: modrej@natur.cuni.cz

**Abstrakt:** Cílem této diplomové práce byla příprava makrocyclických ligandů odvozených od DO3A a DO2A skeletu s vyměnitelnými protony na koordinujících se aminových skupinách pendantního ramene, které by po zakomplexování s vhodnými paramagnetickými ionty mohly sloužit jako kontrastní látky typu CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer), čili jako kontrastní látky využívající přenosu saturace. Byly připraveny ligandy s jednou ( $\mathbf{H_3L^1}$ ) a dvěma ( $\mathbf{H_2L^2}$ ) aminoethylovými skupinami. Dále byly připraveny ligandy  $\mathbf{H_3L^1Me}$  a  $\mathbf{H_3L^12Me}$  (strukturně podobné ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$ ) s jedním vyměnitelným protonem a bez vyměnitelného protonu pendantního ramene. U ligandů  $\mathbf{H_3L^1}$  a  $\mathbf{H_2L^2}$  bylo pomocí pH  $^1\text{H}$  NMR titrace a potenciometrické titrace studováno jejich acidobazické chování. Pomocí potenciometrických titrací byly určeny konstanty stability komplexů ligandů  $\mathbf{H_3L^1}$  a  $\mathbf{H_2L^2}$  s vybranými ionty kovů. Byl studován efekt CEST europitých a ytterbitých komplexů ligandů  $\mathbf{H_3L^1}$ ,  $\mathbf{H_3L^1Me}$  a  $\mathbf{H_3L^12Me}$  v roztocích. Z teplotních  $^{17}\text{O}$  NMR experimentů byl určen rezidenční čas molekuly vody ve vnitřní koordinační sféře  $\text{Gd}^{3+}$  komplexu ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$ .

**Klíčová slova:** CEST, MRI, aminoethyl, DO3A, DO2A, relaxace  $^{17}\text{O}$

Title: MRI Contrast Agents Based on Saturation Transfer

Author: Bc. Tereza Krchová

Department: Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University in  
Prague

Supervisor: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Supervisor's email: modrej@natur.cuni.cz

**Abstract:** The aim of this thesis was to synthesize macrocyclic ligands (based on the DO3A and DO2A framework) with exchangeable protons on the aminic coordinating groups that could be (after the complexation with suitable paramagnetic metal ions) potential contrast agents based on saturation transfer, so called CEST contrast agents (Chemical Exchange Saturation Transfer). Two ligands  $\mathbf{H_3L^1}$  and  $\mathbf{H_2L^2}$  with one and two aminoethyl groups have been synthesized. The structurally similar ligands  $\mathbf{H_3L^1Me}$  and  $\mathbf{H_3L^12Me}$  with one exchangeable proton and without it have been also prepared. The protonation constants of the ligands  $\mathbf{H_3L^1}$  and  $\mathbf{H_2L^2}$  have been determined by pH  $^1\text{H}$  NMR and potentiometric titrations. The stability constants of metal ion complexes with  $\mathbf{H_3L^1}$  and  $\mathbf{H_2L^2}$  have been also determined by potentiometry. The CEST effect of  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Yb}^{3+}$  complexes with  $\mathbf{H_3L^1}$ ,  $\mathbf{H_3L^1Me}$  and  $\mathbf{H_3L^12Me}$  in solution have been studied. The residence lifetime of the inner-sphere water molecule has been determined for  $\text{Gd-L}^1$  complex.

**Keywords:** CEST, MRI, aminoethyl, DO3A, DO2A,  $^{17}\text{O}$  relaxation

# OBSAH

<b>OBSAH.....</b>	<b>5</b>
<b>1 TEORETICKÝ ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
1.1 NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE (NMR).....	8
1.1.1 Fyzikální princip.....	8
1.1.2 Relaxační procesy .....	11
1.1.3 Chemická výměna.....	12
1.2 TOMOGRAFIE MAGNETICKÉ REZONANCE (MRI).....	13
1.2.1 Chemická povaha $T_1$ a $T_2$ kontrastních látek.....	14
1.2.2 Kontrastní látky typu CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer) .....	16
1.3 METODY STUDIA PŘIPRAVENÝCH KOMPLEXŮ.....	20
1.3.1 Rychlost výměny vody .....	20
1.3.2 Stanovení koncentrace komplexů v roztocích .....	22
1.3.3 Izomerie komplexů v roztocích .....	22
<b>2 MOTIVACE A CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>24</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>25</b>
3.1 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLÍ.....	25
3.2 METODY CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH LÁTEK.....	26
3.2.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR).....	26
3.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS).....	26
3.2.3 Elementární analýza .....	26
3.2.4 Rentgenostrukturní analýza.....	26
3.2.5 Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	27
3.2.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	27
3.3 SYNTETICKÁ ČÁST .....	28
3.3.1 1,4,7-tris( <i>t</i> -butylkarboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (2·HBr) .....	28
3.3.2 <i>N</i> -(2-bromethyl)ftalimid (5).....	29
3.3.3 1,4,7-tris(karboxymethyl)-10-(2-aminoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan ( $H_3L^1 \cdot 3,5H_2O$ ) .....	30
3.3.4 1,4,7-tris(karboxymethyl)-10-[2-( <i>N,N</i> -dimethylamino)ethyl]-1,4,7,10- -tetraazacyklododekan ( $H_3L^1 2Me$ ).....	32
3.3.5 2-[ <i>N</i> -( <i>t</i> -butyloxykarbonyl)- <i>N</i> -methylamino]ethanol (10).....	33

3.3.6	2-[ <i>N</i> -( <i>t</i> -butyloxykarbonyl)- <i>N</i> -methylamino]bromethan (11) .....	33
3.3.7	2-[ <i>N</i> -( <i>t</i> -butyloxykarbonyl)- <i>N</i> -methylamino]ethyl-4,7,10-tris( <i>t</i> -butylkarboxymethyl)- -1,4,7,10-tetraazacyklododekan (12) .....	34
3.3.8	2-[ <i>N</i> -(benzyloxykarbonyl)- <i>N</i> -methylamino]ethanol (14) .....	35
3.3.9	2-[ <i>N</i> -(benzyloxykarbonyl)- <i>N</i> -methylamino]bromethan (15) .....	35
3.3.10	1,4,7-tris(karboxymethyl)-10-[2-( <i>N</i> -methylamino)ethyl]-1,4,7,10- -tetraazacyklododekan ( $H_3L^1Me$ ) .....	36
3.3.11	1,7-bis(benzyloxykarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (18) .....	38
3.3.12	1,7-bis(benzyloxykarbonyl)-4,10-bis( <i>t</i> -butylkarboxymethyl)-1,4,7,10- -tetraazacyklododekan (19) .....	39
3.3.13	1,7-bis-( <i>t</i> -butylkarboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (20) .....	39
3.3.14	1,7-bis(karboxymethyl)-4,10-bis(2-aminoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan ( $H_2L^2 \cdot 2HCl \cdot 2,5H_2O$ ) .....	40
3.3.15	Příprava komplexů ligandů $H_3L^1$ , $H_3L^1Me$ a $H_3L^12Me$ s lanthanoidy .....	42
3.4	METODY STUDIA PŘIPRAVENÝCH LIGANDŮ A KOMPLEXŮ .....	43
3.4.1	Potenciometrické titrace .....	43
3.4.2	$^1H$ NMR titrace .....	43
3.4.3	Stanovení koncentrace komplexů v roztocích .....	44
3.4.4	Studium izomerie komplexů v roztocích .....	44
3.4.5	CEST experimenty .....	44
3.4.6	Teplotní $^{17}O$ NMR experimenty .....	45
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	47
4.1	SYNTÉZA LIGANDŮ .....	47
4.1.1	Syntéza ligandů $H_3L^1$ a $H_3L^12Me$ .....	47
4.1.2	Syntéza ligandu $H_3L^1Me$ .....	50
4.1.3	Syntéza ligandu $H_2L^2$ .....	53
4.2	STUDIUM PŘIPRAVENÝCH LIGANDŮ A KOMPLEXŮ .....	56
4.2.1	Potenciometrické titrace .....	56
4.2.2	NMR titrace .....	60
4.2.3	Studium izomerie komplexů v roztocích .....	64
4.2.4	CEST experimenty (měření Z-spekter) .....	66
4.2.5	MRI studie efektu CEST .....	71
4.2.6	Teplotní $^{17}O$ NMR experimenty .....	73
5	ZÁVĚR .....	77
6	PŘÍLOHY .....	79
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	86

8	LITERATURA .....	88
---	------------------	----

# 1 TEORETICKÝ ÚVOD

Od prvních NMR experimentů na molekulárních svazcích, které v roce 1938 uskutečnil (a v roce 1939 výsledky publikoval) pozdější držitel Nobelovy ceny za fyziku Isidor I. Rabi se svou pracovní skupinou<sup>[1]</sup>, a od vůbec prvních pozorování  $^1\text{H}$  NMR signálů, která roku 1945 provedli Edward M. Purcell, Henry C. Torrey a Robert V. Pound na vzorku parafínu a nezávisle na tom o několik měsíců později v roce 1946 Felix Bloch, William W. Hansen a Martin Packard na vzorku vody (také Bloch a Purcell obdrželi za své objevy Nobelovu cenu za fyziku), prošla NMR spektroskopie značným vývojem. NMR ve svých počátcích nevzbuzovala mezi chemiky příliš velkou pozornost. To se ale změnilo v roce 1950, kdy vědci Warren G. Proctor a Fu C. Yu náhodou objevili, že dvě dusíková jádra v molekule  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  mají rozdílnou rezonanční frekvenci. Zjištění, že rezonanční frekvence jádra závisí na jeho chemickém okolí a zavedení s tím souvisejícího pojmu „chemický posun“, znamenalo začátek nového využití NMR jako nástroje ve studiu struktury a vlastností molekul.

Základy pro využití NMR (resp. MRI) v medicíně byly položeny o dvě desetiletí později, kdy lékař a vědecký pracovník Raymond Damadian zjistil, že díky NMR je možné rozlišit různé druhy zvířecí tkáně a že je dokonce možné odlišit zdravou tkáň od tkáně rakovinné. Zanedlouho poté Paul C. Lauterbur získal první MRI obrazy a Sir Peter Mansfield ukázal, jak mohou být signály z MRI matematicky analyzovány<sup>[2,3]</sup>.

V současné době je metoda MRI jednou z nejdůležitějších diagnostických metod klinické medicíny. Díky výbornému prostorovému rozlišení, schopnosti posouzení morfologie a patologie měkkých tkání, diagnostice chorob srdce a cév, diagnostice nádorů a sledování průběhu léčby, se stala nepostradatelným nástrojem v rukou lékařů.

## 1.1 NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE (NMR)

lit.<sup>[4,5,6,7,8]</sup>

### 1.1.1 Fyzikální princip

Základním principem NMR spektroskopie je interakce radiofrekvenčního elektromagnetického záření se spinem atomových jader. Konkrétní (tzv. NMR aktivní) atomová jádra, pokud jsou vložena do vnějšího magnetického pole, jsou schopna absorbovat elektromagnetické záření o určité frekvenci, která je obecně různá pro všechny neekvivalentní atomy v molekule. Jako NMR aktivní označujeme taková jádra, která mají nenulové spinové kvantové číslo ( $I \neq 0$ ). Důležitou charakteristikou těchto jader je magnetický moment  $\mu$ . Pro jeho  $z$ -tovou komponentu  $\mu_z$  platí vztah (1)



$$\mu_z = \gamma m_I \hbar \quad (1)$$

kde je:

$\gamma$ ...gyromagnetický poměr jádra (konstantní pro dané jádro)

$m_I$ ...magnetické kvantové číslo jádra ( $m_I = I, I-1, \dots, -I$ )

$\hbar$ ...redukovaná Planckova konstanta ( $\hbar = h/2\pi$ )

Rezonanční frekvence daného jádra je přímo úměrná síle aplikovaného magnetického pole  $B_0$  a zároveň je závislá na jeho chemickém okolí. To lze vysvětlit tzv. stíněním jader elektrony. Elektrony svým pohybem vytvářejí magnetické pole, které má opačný směr než vnější magnetické pole  $B_0$ . Jádra stejného izotopu, která nemají stejné chemické okolí (tedy nejsou chemicky ekvivalentní), se liší rozložením elektronů ve svém okolí a tím sice velmi nepatrně, ale pozorovatelně, intenzitou stínění. Intenzita stínění je úměrná vnějšímu magnetickému poli  $B_0$  a charakterizujeme ji stínící konstantou  $\sigma$ . Efektivní magnetické pole  $B_{\text{eff}}$ , které působí na jádro, vyjadřuje vztah (2)

$$B_{\text{eff}} = B_0 - \sigma B_0 = B_0(1 - \sigma) \quad (2)$$

kde je:

$B_0$ ...vnější magnetické pole

$B_{\text{eff}}$ ...efektivní magnetické pole

$\sigma$ ...stínící konstanta

Rezonanční frekvence jádra je pak dána vztahem (3) nebo (4)

$$\omega = \gamma B_0(1 - \sigma) \quad (3)$$

$$\nu = \frac{\gamma B_0(1 - \sigma)}{2\pi} \quad (4)$$

Velkou výhodou NMR spektroskopie je univerzálnost metody z hlediska měření a interpretace výsledků. Spektrum je zaznamenáno ve škále chemického posunu  $\delta$  (ppm), tedy v relativní stupnici, kdy signál o daném  $\delta$  je charakteristický pro určitý atom dané sloučeniny nezávisle na síle externího magnetického pole a je tedy nezávislý i na konkrétním typu přístroje (5)

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{st}}}{\nu_{\text{st}}} 10^6 \text{ [ppm]} \quad (5)$$

kde je:

$\nu$ ...rezonanční frekvence měřeného jádra studované sloučeniny

$\nu_{\text{st}}$ ...rezonanční frekvence měřeného jádra referenčního standardu

Při vložení vzorku do magnetického pole se spiny jader atomů s nenulovým spinovým číslem ( $I \neq 0$ ) zorientují vzhledem k vektoru intenzity magnetického pole a rozdělí se při tom na energetické hladiny (jednotlivé spinové stavy popisuje hodnota  $m_I$ ). Rozdíl v populaci těchto energetických hladin vytvoří detekovatelnou změnu. Počet vzniklých energetických hladin je určen hodnotou spinového kvantového čísla  $I$  (počet stavů  $= 2I + 1$ ), proto u izotopů s  $I = \frac{1}{2}$  (např.  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ ) zaujmou jaderné spiny dva energetické stavy s magnetickým kvantovým číslem  $m_I = +\frac{1}{2}$  a  $m_I = -\frac{1}{2}$ . Dochází k uspořádání spinů buď v paralelním nebo antiparalelním směru s vektorem  $B_0$ , každé orientaci přísluší jistá energie  $E_{m_I}$ , pro tu platí vztah (6)

$$E_{m_I} = -\mu_z B_0 = -\gamma \hbar B_0 m_I \quad (6)$$

Energetický rozdíl mezi dvěma sousedními energetickými hladinami je tedy (7)

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (7)$$

Populace jednotlivých energetických hladin můžeme popsat Boltzmannovou distribucí (8)

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/kT} \quad (8)$$

kde je:

$k$ ...Boltzmannova konstanta

$T$ ...termodynamická teplota

$N_\alpha, N_\beta$ ...populace jednotlivých spinových stavů

Přechod mezi spinovými stavy je v NMR řešen pomocí krátkých radiofrekvenčních pulzů. Pro vyvolání přechodů mezi spinovými stavy musí být tedy energie těchto pulzů rovna rozdílu energie spinových stavů  $\Delta E$ .

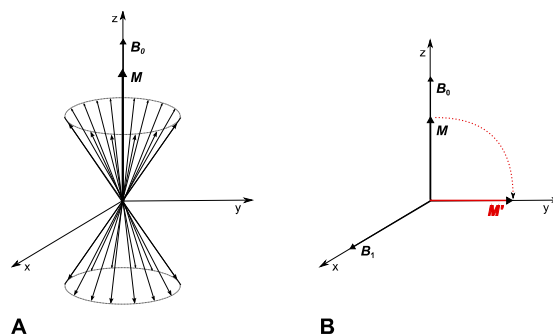
Při popisu reálného vzorku je třeba zavést pojem „soubor spinových stavů“. Každý vzorek se skládá z velkého počtu jader a každému spinu v tomto vzorku přísluší jaderný magnetický moment. V magnetickém poli  $B_0$  koná každý magnetický moment precesní pohyb s tzv. Larmorovou frekvencí  $\nu_L$  nebo též  $\omega_L$  (9) a (10)

$$\nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (9)$$

$$\omega_L = \gamma B_0 \quad (10)$$

Soubor spinových stavů můžeme popsat vektorem celkové magnetizace  $M$ , který je dán vektorovým součtem magnetických momentů jednotlivých jader (Obrázek 1). Tato makroskopická veličina je orientována ve směru vnějšího magnetického pole  $B_0$ . Vektor magnetizace lze poté aplikací různě dlouhého pulzu s magnetickou indukcí  $B_1$  (pole  $B_1$  je kolmé ke směru pole  $B_0$ ) „sklopit“ o libovolný úhel vzhledem k původnímu rovnovážnému směru (Obrázek 1).

Takto „sklopený“ vektor magnetizace je stále nucen vykonávat precesní pohyb o Larmorově frekvenci  $\nu_L$  dané intenzitou magnetického pole  $B_0$ , tento pohyb je snímán snímací cívkou jako indukce napětí. Vlastní NMR signál je získán Furierovou transformací signálu FID (Free Induction Decay), který je generován na přijímacích cívkách v důsledku oscilace magnetizace vzorku.



**Obrázek 1: A)** Znázornění magnetizace  $M$  (vektorový součet všech magnetických momentů v poli  $B_0$ ). **B)** Sklápění vektoru magnetizace  $M$  pulzem pole  $B_1$  do roviny xy.

### 1.1.2 Relaxační procesy

Po vychýlení z rovnovážné polohy bude mít soubor spinových stavů (resp. vektor celkové magnetizace  $M$ ) tendenci navrátit se do původního rovnovážného (stacionárního) stavu. Mechanizmy, které tento proces popisují, se označují jako tzv. relaxační procesy. Rozlišujeme dva typy relaxace:

**1)** Longitudinální (spin-mřížková) relaxace, která je charakterizována relaxačním časem  $T_1$  a souvisí s nárůstem vektoru magnetizace v ose z (Obrázek 2-A). Tento typ relaxace je způsoben interakcí spinového systému s okolím (s mřížkou) a je spojen s výměnou energie.

**2)** Transverzální (spin-spinová) relaxace, která je charakterizována relaxačním časem  $T_2$  a souvisí s úbytkem vektoru magnetizace v rovině xy (Obrázek 2-B). Tento typ relaxace je spojen se spin-spinovými interakcemi uvnitř vzorku, k transverzální relaxaci také nezanedbatelně přispívá nehomogenita magnetického pole.

Časový průběh těchto relaxačních procesů popisují Blochovy rovnice (11) a (12)

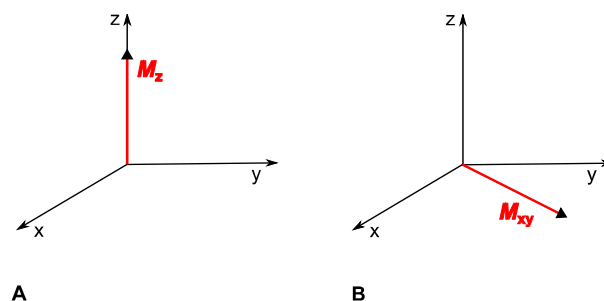
$$M_z(t) = M_0[1 - \exp(-t/T_1)] + M_z(t_0)\exp(-t/T_1) \quad (11)$$

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(t_0)\exp(-t/T_2) \quad (12)$$

kde je:

$M_0$ ...rovnovážná magnetizace

$t$ ...čas



**Obrázek 2: A)** Znázornění složky magnetizace  $M_z$ . **B)** Znázornění složky magnetizace  $M_{xy}$ .

### 1.1.3 Chemická výměna

Do této chvíle jsme předpokládali, že se sledované jádro dané molekuly vyskytuje ve stabilním chemickém okolí a jeho chemický posun se nemění. Procesy, během kterých se mění chemické okolí (resp. rezonanční frekvence) sledovaného jádra (např. chemické reakce, konformační změny či mezomerní přechody), označujeme v NMR spektroskopii pojmem „chemická výměna“. Při kvantifikaci rychlosti chemické výměny je třeba specifikovat rezonanční frekvenci spektrometru, na kterém bylo měření prováděno (platí, že čím vyšší je rezonanční frekvence spektrometru, tím rychlejší chemické výměny můžeme sledovat).

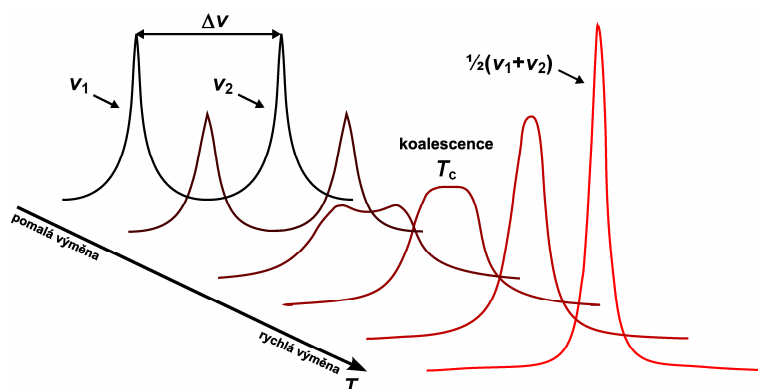
Uvažujme symetrickou chemickou výměnu mezi stavem 1 a 2. Jestliže je rychlost chemické výměny  $k_{\text{ex}}$  významně menší než rozdíl rezonančních frekvencí dvou vyměňujících se atomů  $\Delta\nu = \nu_1 - \nu_2$  (Hz) při určité velikosti vnějšího magnetického pole, v NMR spektru je možné pozorovat oba dva signály vyměňujících se atomů a tuto chemickou výměnu označujeme za tzv. „pomalou“ ( $k_{\text{ex}} \ll \Delta\nu$ ). Pokud je rychlost chemické výměny  $k_{\text{ex}}$  významně větší než rozdíl rezonančních frekvencí  $\Delta\nu$  (Hz) dvou vyměňujících se atomů, v NMR spektru pozorujeme pouze jeden signál s rezonanční frekvencí  $(\nu_1 + \nu_2)/2$  a tuto výměnu označujeme za tzv. „rychlou“ ( $k_{\text{ex}} \gg \Delta\nu$ ).

Rychlost chemické výměny je závislá na teplotě  $T$  (Obrázek 3). K přechodu mezi pomalou a rychlou chemickou výměnou dochází při tzv. koalescenční teplotě  $T_c$ , kdy se rozdíl rezonančních frekvencí vyměňujících se atomů stává srovnatelný s rychlostí jejich výměny  $k_{\text{ex}}$  a platí (13)

$$k_{\text{ex}} = \frac{\pi \Delta\nu}{\sqrt{2}} \quad (13)$$

Se zvyšující se rychlostí chemické výměny  $k_{\text{ex}}$  roste zároveň příspěvek chemické výměny k rozšiřování signálů vyměňujících se atomů ve spektru, dokud není dosaženo teploty koalescence  $T_c$ . S další zvyšující se rychlostí výměny dochází k zužování signálu a při vysoké rychlosti chemické výměny (při určité velikosti vnějšího magnetického pole) přestává být rozšíření spektrální čáry pozorovatelné.

V předchozích případech byly popsány takové režimy chemické výměny, které mají vliv na NMR spektrum a je tedy možné je z NMR spektra přímo kvantifikovat. Chemickou výměnu, která je příliš pomalá a nedochází ke znatelnému rozšiřování signálů ve spektru, je možné sledovat pomocí metod



**Obrázek 3:** Znáznornění symetrické chemické výměny mezi dvěma stavy (teplotní závislost NMR spekter).

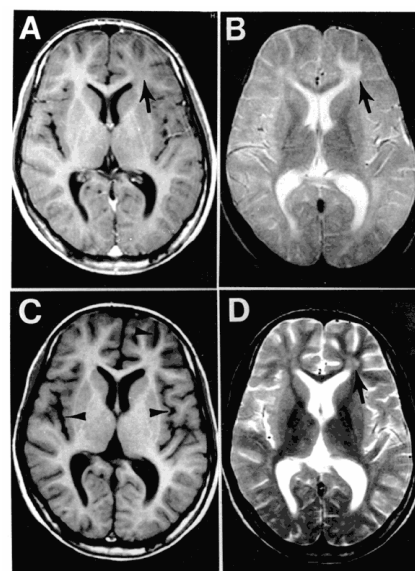
přenosu magnetizace. Pravděpodobně nejpoužívanější metodou pro studium dynamických a výměnných procesů v NMR spektroskopii je dvojdimenzionální technika 2D EXSY (Exchange Spectroscopy).

## 1.2 TOMOGRAFIE MAGNETICKÉ REZONANCE (MRI)

lit.<sup>[9,10,11,12]</sup>

Jak již bylo zmíněno v úvodu, tomografie magnetické rezonance (MRI) je zobrazovací technika hojně užívaná v medicíně k vyšetření vnitřních orgánů a je založena na principech nukleární magnetické rezonance (NMR). Velkou výhodou této metody (v porovnání např. s metodami PET, SPECT nebo CT) je bezesporu fakt, že nevystavuje sledovaný objekt účinkům škodlivého vysoceenergetického ionizujícího záření a poskytuje snímky s vysokým prostorovým rozlišením (pod 1 mm<sup>3</sup>). Tomografie magnetické rezonance (MRI) navíc často představuje jedinou spolehlivou diagnostickou metodu pro rozpoznání abnormalit v mozku.

Pomocí MRI je možné sledovat chování molekul vody ve vnějším magnetickém poli (jelikož lidské tělo obsahuje až 70 hm. % vody, je nejčastěji měřeným jádrem právě jádro <sup>1</sup>H molekuly H<sub>2</sub>O). Podle experimentálního uspořádání lze získat MRI obrazy, které odpovídají distribuci molekul vody v jednotlivých tkáních (snímky tzv. vážené protonovou hustotou), nebo také obrazy odpovídající longitudinálním ( $T_1$ ) a transverzálním ( $T_2$ ) relaxačním časům (tzv.  $T_1$  a  $T_2$  vážené snímky). Chování molekul vody (resp. hodnoty relaxačních časů) závisí na jejich koncentraci v jednotlivých tkáních, dále na pH, na teplotě a také na koncentraci dalších látek přítomných v tělních tekutinách. Chování molekul vody lze zásadně ovlivnit aplikací paramagnetických látek nebo částic, tzv. kontrastních látek (CA, Contrast Agents), které po



**Obrázek 4:**  $T_1$  (A, C) a  $T_2$  (B, D) vážené snímky mozku (axiální řez). Obrázek byl převzat z lit.<sup>[13]</sup>.

intravenózním podání putují krevním řečištěm do sledované tkáně. CA snižují  $T_1$  a  $T_2$  relaxační časy a tím zvyšují rychlost relaxace protonů v okolních molekulách vody. To má za následek zvýšení kontrastu mezi tkáněmi s různou distribucí kontrastní látky (tj. i mezi zdravou a poškozenou tkání) a lepší rozlišení vnitřní struktury orgánů. Účinnost kontrastní látky vyjadřuje tzv. relaxivita, tj. rychlost relaxace protonů molekul vody v 1mM roztoku dané kontrastní látky. Tato veličina je závislá na mnoha parametrech. Mezi tyto parametry patří například intenzita magnetického pole tomografu, počet molekul vody ( $q$ ) koordinovaných k paramagnetickému iontu (tj. počet molekul vody v 1. koordinační sféře), počet molekul vody ( $q_{ss}$  a  $q_{os}$ ) v okolí komplexu

(tj. počet molekul vody v druhé a vnější hydratační sféře), rychlost výměny koordinovaných molekul vody (reprezentovaná obvykle dobou setrvání koordinované molekuly vody v komplexu,  $\tau_m$ ) s molekulami vody v okolí komplexu nebo rotační korelační čas ( $\tau_R$ ), který představuje celkovou pohyblivost komplexu vůči molekulám vody v roztoku.

Americká radiologická společnost uvádí, že ročně je po celém světě provedeno přes sto milionů vyšetření pomocí MRI a přibližně v 35–40 % případů se při vyšetření používají kontrastní látky (z toho v 99 % případů se jedná o  $T_1$  kontrastní látky na bázi  $Gd^{3+}$ )<sup>[12]</sup>.

### 1.2.1 Chemická povaha $T_1$ a $T_2$ kontrastních látek

Jak již bylo řečeno výše, v přítomnosti paramagnetických látek je chování molekul vody významně ovlivněno a dochází ke zkrácení relaxačních časů  $T_1$  a  $T_2$ . Jako  $T_1$  kontrastní látky jsou označovány paramagnetické komplexy kovů, které snižují relaxační čas  $T_1$ , při použití vhodné zvolené pulzní sekvence zvyšují intenzitu signálu v místě, kde je jejich koncentrace dominantní, a v MRI obrazu vytváří tzv. pozitivní kontrast (tzn. v MRI obrazu „zesvětlují tkáň“). Jako  $T_2$  kontrastní látky jsou označovány superparamagnetické částice, které snižují  $T_2$  relaxační čas, snižují intenzitu signálu v místě svého výskytu a poskytují tzv. negativní kontrast (projeví se „ztmavnutím“ zobrazované tkáně)<sup>[11]</sup>.

#### $T_1$ kontrastní látky

$T_1$  kontrastní jsou z chemického hlediska komplexy paramagnetických iontů kovů s vhodnými ligandy. Nejčastěji se jedná o komplexy iontu  $Gd^{3+}$ , v menší míře se uplatňují komplexy s ionty  $Mn^{2+}$  nebo  $Fe^{3+}$ . Ion  $Gd^{3+}$  má nejvyšší možný elektronový spin, jeho sedm nepárových  $f$ -elektronů způsobuje vysoký efektivní magnetický moment  $\mu_{eff}$ . Některé  $Ln^{3+}$  ionty (například  $Dy^{3+}$ ,  $Ho^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ) mají vyšší  $\mu_{eff}$  než gadolinitý ion, výhodou  $Gd^{3+}$  je ale jeho totálně symetrický elektronový stav  $^8S_{7/2}$ , díky němuž má přibližně  $10^5 \times$  delší elektronové relaxační časy než jiné ionty  $Ln^{3+}$ . Z tohoto důvodu mají ionty  $Gd^{3+}$  zásadní vliv na relaxaci okolních jader<sup>[14]</sup>.

Ionty  $Gd^{3+}$  jsou ve své volné (respektive hydratované) podobě velmi jedovaté (pro myš:  $LD_{50} = 0,2 \text{ mmol kg}^{-1}$ )<sup>[15]</sup>, dochází k jejich akumulaci v játrech a kostech a díky podobnému iontovému poloměru s ionty  $Ca^{2+}$  blokují vazebná místa vápníku v biologických systémech<sup>[16]</sup>. Pro použití v klinické praxi musí být gadolinité ionty vázány do extrémně stálých komplexů, aby nedošlo k jejich uvolnění do organismu. Komplex musí být inertní vůči působení konkurenčních ligandů v organismu, nesmí tedy podléhat transchelataci a musí být inertní vůči transmetalacním reakcím, ke kterým by (vzhledem k vysoké koncentraci některých iontů v organismu) mohlo docházet<sup>[9]</sup>.

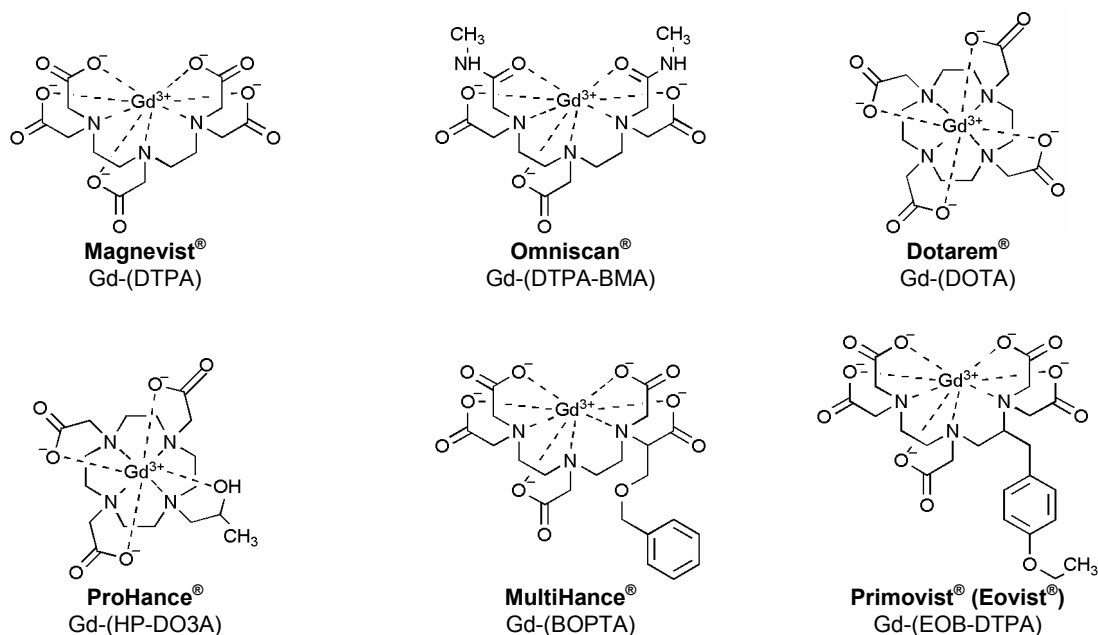
Za první moderní kontrastní látku je považován komplex gadolinitého iontu s diethylenetriaminpentaoctovou kyselinou DTPA, který byl pro klinické použití schválen v roce 1988. V dnešní době se v klinické praxi používá několik nízkomolekulárních gadolinitých

komplexů (odvozených od acyklického ligandu DTPA a cyklického ligandu DOTA, resp. DO3A). Mezi neselektivní extracelulární CA patří např. Magnevist<sup>®</sup>, Omniscan<sup>®</sup>, Dotarem<sup>®</sup> nebo ProHance<sup>®</sup>. Tyto látky jsou po nitrožilní aplikaci rychle distribuovány do extracelulárního prostoru. Eliminovány jsou tyto CA výhradně ledvinami<sup>[17]</sup>. MultiHance<sup>®</sup> a Primovist<sup>®</sup> vykazují selektivitu k jaterním buňkám (přítomnost aromatického kruhu ve struktuře těchto komplexů zvyšuje afinitu k sérovému albuminu a k hepatocytům)<sup>[18]</sup>. Příklady výše zmiňovaných klinicky používaných kontrastních látek uvádí Obrázek 5.

## **$T_2$ kontrastní látky**

Ve srovnání s  $T_1$  kontrastními látkami začaly být  $T_2$  kontrastní látky studovány později. Z chemického hlediska se jedná o nanočástice oxidů železa ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o velikosti několika jednotek až několika desítek nanometrů, obalené např. vrstvou dextransu, siloxanu nebo polyethylenglykolu tak, aby bylo zabráněno jejich shlukování (díky tomuto „obalu“ se jejich velikost může zvýšit až na několik stovek nanometrů). V závislosti na velikosti částic se dělí tyto kontrastní látky do tří skupin:

- USPIO** (Ultra-small SuperParamagnetic Iron Oxide) o hydrodynamickém průměru  $d < 50$  nm (částice obsahují pouze jedno magnetické jádro s průměrem 4–5 nm)
- SPIO** (small SuperParamagnetic Iron Oxide) o hydrodynamickém průměru  $50 \text{ nm} < d < 1 \mu\text{m}$  (částice zpravidla obsahují více magnetických jader s průměrem 4–5 nm na jednu částici)
- MPIO** (Micron-sized Particles of Iron Oxide) o hydrodynamickém průměru v řádech mikrometrů<sup>[10]</sup>



**Obrázek 5:** Struktury vybraných komplexů  $\text{Gd}^{3+}$  používaných v MRI jako kontrastních látek, molekula koordinované vody (pro všechny komplexy  $q = 1$ , kde  $q$  je hydratační číslo, které udává počet koordinovaných molekul vody) byla pro přehlednost vynechána.

### 1.2.2 Kontrastní látky typu CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer)

Kromě již zmíněných  $T_1$  a  $T_2$  kontrastních látek jsou v současné době předmětem výzkumu mnoha laboratoří po celém světě tzv. kontrastní látky typu CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer), které jsou založeny na přenosu saturace prostřednictvím chemické výměny mezi vyměnitelnými protony vody a dané diamagnetické či paramagnetické látky.

Jev chemické výměny začal být v NMR spektroskopii studován již před mnoha lety. V roce 1957 H. M. McConnell a D. D. Thompson upravili Blochovy rovnice tak, aby obsahovaly podmínky pro chemickou výměnu a poté vypočítali a publikovali rychlost chemické výměny protonů vody s protony amonného kationtu<sup>[19]</sup>. Techniku využívající efektu CEST ale poprvé představili v roce 1963 S. Forsén a R. A. Hoffman, kteří tuto metodu použili ke zjištění rychlosti chemické výměny protonů mezi molekulami vody a molekulami salicylaldehydu<sup>[20]</sup>. Od té doby byla metoda CEST široce aplikována v chemii a biologii k určování rychlostních konstant jednoduchých reakcí. Koncem 20. století pak byla metoda CEST poprvé představena jako zobrazovací technika pro tomografii magnetické rezonance.

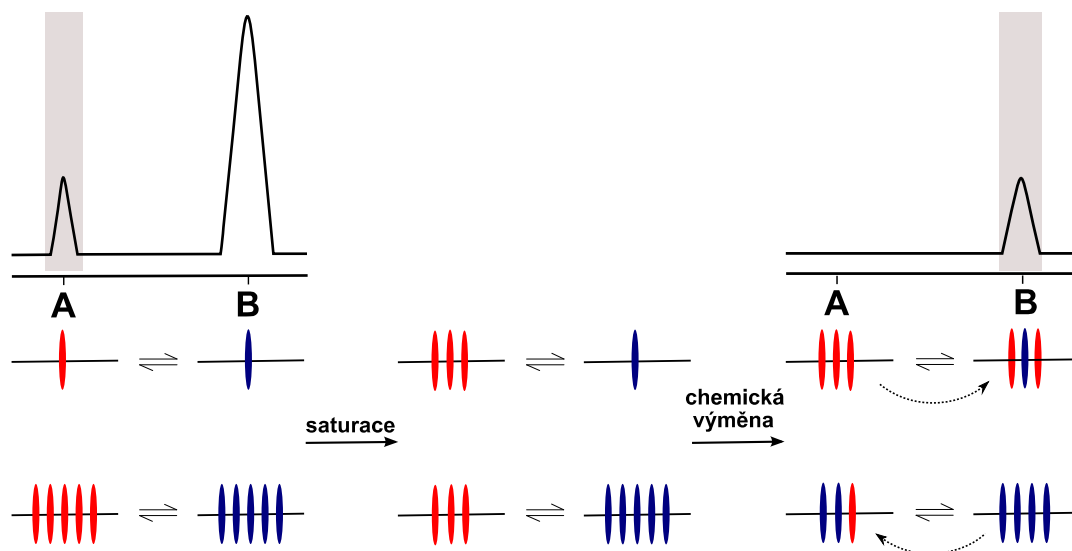
Technika přenosu saturace byla v MRI nejprve studována na endogenních systémech<sup>[21]</sup>, až v roce 2000, kdy R. S. Balaban se svou skupinou publikoval první experimenty založené na chemické výměně a přenosu saturace mezi protony vody a labilními protony diamagnetických látek o nízké koncentraci (jednalo se o experiment s kyselinou barbiturovou; právě v této publikaci byl tento nový typ MRI kontrastu poprvé označen jako CEST)<sup>[22]</sup>, se začalo rozvíjet studium přenosu saturace také na exogenních látkách. Od té doby byl efekt CEST zkoumán na mnoha diamagnetických molekulách s vyměnitelnými protony (aminokyseliny, cukry, metabolity atd.). Bylo také zjištěno, že některé látky, které poskytují CEST efekt, mohou být využity jako teplotní a pH sondy, jelikož jsou citlivé na okolní podmínky<sup>[23,24,25]</sup>. V současné době je dalším předmětem výzkumu studium účinných kontrastních látek CEST ze třídy komplexů paramagnetických kovů (PARACEST)<sup>[26,27]</sup>. U těchto komplexů je v některých případech možné pozorovat efekt CEST také na molekulách vody, které jsou koordinované k centrálnímu atomu kovu. Může tedy docházet k přenosu saturace mezi koordinovanými a „volnými“ molekulami vody v roztoku<sup>[27,28]</sup>. Výhody a příklady studovaných kontrastních látek PARACEST budou zmiňovány v dalším textu.

#### Princip efektu CEST

Jak již bylo zmíněno výše, princip efektu CEST spočívá v optimálně rychlé chemické výměně labilního protonu (**A**) určité funkční skupiny (-OH, -NH, -NH<sub>2</sub>) s protony vody (**B**). Při selektivní saturaci NMR signálu vyměnitelného protonu **A** funkční skupiny dochází k poklesu intenzity tohoto signálu ve spektru. Pokud aplikujeme presaturační pulz o dostatečné energii, dojde k úplnému vymizení signálu z NMR spektra (rozdíl v populacích spinových stavů dvou



energetických hladin je nulový, tj.  $N_\alpha = N_\beta$ ), systém je tzv. saturevaný. Pokud je tento systém v chemické výměně se systémem druhého vyměnitelného protonu **B** (tj. vody), dojde k přenosu saturace ze systému **A** na systém **B**, a tedy i k poklesu intenzity signálu vody v NMR spektru. Kontrastní látky typu CEST tedy v MRI obrazu poskytují negativní kontrast (Obrázek 6).



**Obrázek 6:** Ilustrace mechanismu CEST (selektivní saturace signálu **A**, přenos saturace na signál **B**).

Aby byl efekt CEST pozorovatelný, nesmí být longitudinální relaxační rychlost vyměnitelného protonu **A** větší než rychlost chemické výměny mezi systémem **A** a **B** (systém **A** by zrelaxoval zpět do základního stavu, populace spinových stavů tohoto systému by se řídila Boltzmannovou distribucí a k přenosu saturace by nemohlo dojít)<sup>[29]</sup>. Zároveň musí být chemická výměna mezi systémem **A** a **B** při daném  $B_0$  relativně pomalá, aby bylo možné signál **A** selektivně saturovat. Rychlost této chemické výměny  $k_{\text{ex}}$  musí být menší než rozdíl rezonančních frekvencí protonů **A** a **B**, musí platit (14), (15):

$$k_{\text{ex}} < \Delta\nu \quad (14)$$

$$\Delta\nu = |\nu_A - \nu_B| \quad (15)$$

Výsledky CEST experimentů se obvykle prezentují jako tzv. Z-spektrum (někdy též CEST-spektrum). Z-spektrum popisuje relativní intenzitu signálu vody v NMR spektru ( $I_z/I_0$ ) v závislosti na frekvenci presaturačního pulzu. Spektrum tedy obsahuje intenzivní pík odpovídající presaturaci signálu vody (tomuto signálu je v Z-spektru pro přehlednost přiřazen chemický posun  $\delta_\nu = 0$  ppm) a případně další píky, které odpovídají efektu CEST vyměnitelných protonů určité funkční skupiny/protonů koordinované vody studované molekuly.

## PARACEST (Paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer)

Jelikož jsou signály vyměnitelných protonů diamagnetických látek v  $^1\text{H}$  NMR spektru v relativně malé vzdálenosti od signálu vody ( $\pm 5$  ppm) a je tedy obtížné provádět selektivní saturaci, aniž by presaturační pulz aplikovaný na daný vyměnitelný proton signál vody přímo neovlivňoval, začaly být studovány kontrastní látky typu CEST ze třídy komplexů paramagnetických kovů, jejichž nepárové elektrony indukují velké rozdíly chemických posunů mezi protony vody a daným vyměnitelným protonem<sup>[26,27,30]</sup>.

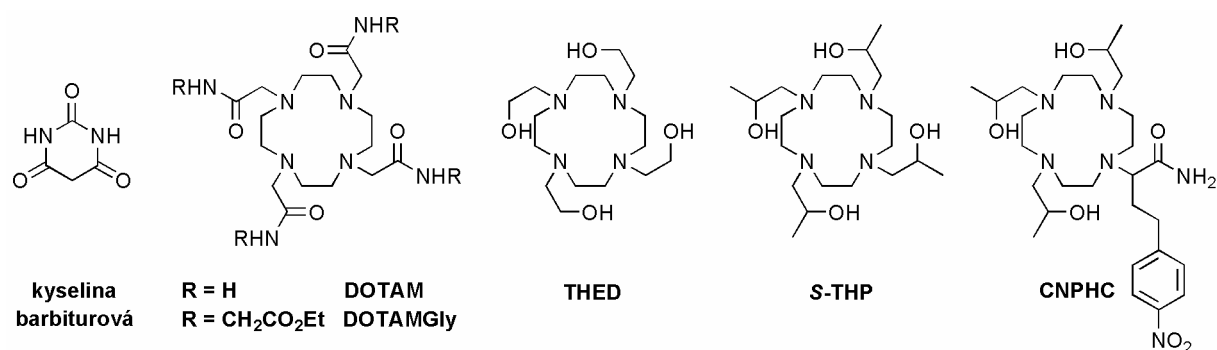
První PARACEST efekt byl pozorován na komplexech lanthanoidů s tetraamidy ligandu DOTA (Obrázek 7), jejichž komplexy mohou v některých případech poskytovat efekt CEST díky vyměnitelným protonům amidových skupin. Někdy je možné efekt CEST pozorovat na molekule vody koordinované k centrálnímu atomu paramagnetického komplexu. U některých europitých komplexů těchto ligandů je rychlost výměny vody extrémně pomalá a v  $^1\text{H}$  NMR spektru je možné signál koordinované vody pozorovat (tento signál bývá obvykle v NMR spektru pozorovatelný v případě, že je daný komplex rozpuštěn v acetonitrilu<sup>[28,31]</sup>; v některých případech je ale možné signál koordinované vody pozorovat i v  $^1\text{H}$  NMR spektru naměřeném s vodným roztokem komplexu<sup>[32]</sup>). Chemický posun signálu koordinované vody se nachází ve velké vzdálenosti od signálu „volné“ vody (ve srovnání s chemickým posunem NH protonů kyseliny barbiturové<sup>[29]</sup> je vzdálenost vyměnitelných protonů koordinované vody europitých komplexů ligandů DOTAM a DOTAMGly (Obrázek 7) asi  $10\times$  větší, tj. přibližně  $+50$  ppm vzhledem k  $\delta_v = 0$  ppm)<sup>[33,27]</sup>, je tedy možné signál koordinované vody bez větších potíží selektivně saturovat. V  $^1\text{H}$  NMR spektru některých komplexů těchto ligandů je možné rozlišit také signály amidových protonů pendantních skupin (tyto vyměnitelné protony je možné sledovat spíše u komplexů s ionty  $\text{Yb}^{3+}$  a  $\text{Dy}^{3+}$ , u europitých komplexů nebývají viditelné; komplexy  $\text{YbDOTAM}^{3+}$  a  $\text{DyDOTAM}^{3+}$  poskytují v  $^1\text{H}$  NMR spektru dokonce navzájem rozlišitelné signály axiálních a ekvatoriálních amidových protonů<sup>[26]</sup>).

V Z-spektru komplexu  $\text{DyDOTAM}^{3+}$  (lit.<sup>[29]</sup>) je možné pozorovat CEST efekt vyměnitelných protonů amidových skupin ( $+80$  ppm) i efekt CEST, který poskytuje molekula koordinované vody ( $-720$  ppm). Ze spektra je patrné, že CEST efekt, který poskytují amidové protony, je intenzivnější než CEST efekt koordinované vody. To lze vysvětlit dvěma způsoby. Protony koordinované vody relaxují rychleji než protony amidových skupin. V případě koordinované vody je tedy snížena efektivita přenosu saturace. Zároveň komplex  $\text{DyDOTAM}^{3+}$  obsahuje osm vyměnitelných  $\text{NH}_2$  protonů, koordinovaná molekula vody obsahuje pouze dva vyměnitelné protony, takže lze očekávat čtyřnásobné zvýšení efektu CEST amidových protonů vůči CEST efektu koordinované vody<sup>[29,33]</sup>.

Jako alternativa ke kontrastním látkám PARACEST s vyměnitelnými protony amidových skupin byly studovány také paramagnetické komplexy s vyměnitelnými protony koordinujícími se hydroxylových skupin. U europitého komplexu ligandu *S*-THP (Obrázek 7) bylo zjištěno,

že chemická výměna mezi protony vody a vyměnitelnými protony OH skupin je příliš rychlá (pro dané  $B_0$  a  $\Delta\nu$ ) a CEST efekt není pozorovatelný<sup>[34]</sup>. Na druhou stranu ytterbitý a ceritý komplex tohoto ligandu při pH = 3,1 (resp. pH = 7) poskytují efekt CEST i v čisté vodě<sup>[35]</sup>. Po nahrazení jedné hydroxyethylové skupiny ligandu *S*-THP pendantním ramenem s amidovou skupinou (ligand CNPHC; Obrázek 7) je možné v Z-spektru komplexu  $\text{EuCNPHC}^{3+}$  (měřeno v acetonitrilu) rozlišit tři signály, které poskytují tři neekvivalentní OH skupiny. S postupným přidávkem vody do roztoku komplexu v acetonitrilu rychlost chemické výměny rapidně roste. Pokud je tento komplex rozpuštěn v čisté vodě, efekt CEST není pozorovatelný<sup>[34]</sup>. Ceritý komplex ligandu THED (Obrázek 7) jako jediný dosud studovaný komplex poskytuje efekt CEST hydroxylových skupin ve vodě při neutrálním pH (pH = 7) bez přítomnosti dalších ligandů, které by efekt CEST ovlivňovaly<sup>[35,36]</sup>.

Jako PARACEST kontrastní látky byly studovány také různé dipeptidové deriváty ligandů DOTA a DOTAM<sup>[37,38]</sup>. Byly zkoumány také vlivy substituentů *para*-substituovaných fenylamidů DOTAMGly na efekt CEST jejich komplexů<sup>[39]</sup>.



**Obrázek 7:** Struktury látek zmiňovaných v textu.

## Výhody CEST/PARACEST zobrazovacích metod

Zobrazovací metody, které využívají efektu CEST (resp. PARACEST), mají několik významných výhod: Zobrazování je řízeno radiofrekvenčními pulzy, jejichž frekvenci je možné měnit. Kontrast je pozorovatelný jen v případě, že aplikujeme radiofrekvenční pulz o specifické frekvenci charakteristické pro daný vyměnitelný proton (popř. pro proton molekuly koordinované vody) dané exogenní/endogenní molekuly. Kontrast je tedy možné „zapnout“ a „vypnout“ dle potřeby. Jelikož se rezonanční frekvence vyměnitelných protonů jednotlivých funkčních skupin liší, každá odpověď v NMR spektru souvisí s konkrétní látkou, pouhou změnou frekvence aplikovaného radiofrekvenčního pulzu je tedy možné sledovat různé vyměnitelné protony. Metodou CEST je zároveň možné detekovat některé vyměnitelné skupiny, které nejsou detekovatelné klasickými metodami MRI. Zobrazovací metoda využívající kontrastních látek typu PARACEST může být navíc mnohem citlivější a měla by být schopna detekovat výrazně nižší koncentrace, než klasické zobrazovací metody MRI.

## 1.3 METODY STUDIA PŘIPRAVENÝCH KOMPLEXŮ

### 1.3.1 Rychlost výměny vody

lit.<sup>[40,41]</sup>

Rychlost výměny (resp. rezidenční čas) molekuly koordinované vody je důležitým parametrem kontrastních látek. Rychlostní konstantu výměny koordinované vody  $k_{\text{ex}}$  ve vnitřní koordinační sféře\* (respektive rezidenční čas  $\tau_m = 1/k_{\text{ex}}$ ) je možné určit z měření teplotní závislosti transverzálního ( $T_2$ ) relaxačního času signálu  $^{17}\text{O}$  molekul vody v roztoku gadolinitého komplexu. Pro komplexy s hydratačním číslem  $q \neq 0$  se obvykle předpokládá, že příspěvek vnější koordinační sféry k  $^{17}\text{O}$   $T_2$  relaxačním časům je možné zanedbat. Po dalších aproximacích lze reciprokou hodnotu  $T_2$   $^{17}\text{O}$  relaxačního času zapsat rovnicí (16)

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)_p = \frac{1}{T_2^{\text{IS}}} = qP_m \left[ \frac{1}{\tau_m + T_{2m}} \right] \quad (16)$$

kde je:

$T_2^{\text{IS}}$ ...transverzální relaxační čas  $^{17}\text{O}$  molekul vody v roztoku gadolinitého komplexu

$P_m$ ...molární zlomek koordinované vody

$q$ ...počet koordinovaných molekul vody (tzv. hydratační číslo)

$\tau_m$ ...rezidenční čas molekul vody ve vnitřní koordinační sféře

$T_{2m}$ ...transverzální relaxační čas vodíkových jader koordinované vody

Pro přímo koordinované molekuly vody je možné předpokládat dominanci skalárního mechanismu  $T_2$  relaxace  $^{17}\text{O}$ . Vzhledem k vysoké hodnotě  $\omega_s$  (Larmorova frekvence elektronu) je možné popsat reciprokou hodnotu  $T_2$   $^{17}\text{O}$  relaxačního času rovnicí (17)

$$\frac{1}{T_2^{\text{SC}}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar}\right)^2 \left(\frac{1}{T_{1e}} + \frac{1}{\tau_m}\right)^{-1} \quad (17)$$

kde je:

$T_2^{\text{SC}}$ ...transverzální relaxační čas  $^{17}\text{O}$  molekul vody ve vnitřní koordinační sféře v roztoku  $\text{Gd}^{3+}$  komplexu (skalární mechanismus)

$A/\hbar$ ...konstanta hyperjemného štěpení

$T_{1e}$ ...elektronový relaxační čas iontu kovu

---

\*V roztoku komplexu je možné rozlišit 3 typy molekul vody, které jsou ovlivněny paramagnetikem: **I.** molekuly vnitřní koordinační sféry (**IS**, **I**nn-**S**phere), tato sféra je tvořena molekulami vody přímo koordinovanými k centrálnímu atomu kovu; **II.** molekuly druhé sféry (**SS**, **S**econd-**S**phere), kterou tvoří molekuly vody vázané ke komplexu vodíkovými vazbami; **III.** molekuly vnější sféry (**OS**, **O**uter-**S**phere), které jsou difundované do blízkosti komplexu.

Závislost rychlostní konstanty  $k_{\text{ex}}$  výměny vody na teplotě popisuje Eyringova rovnice (18)

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{\tau_{\text{m}}} = \frac{k_{\text{B}}T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^{\ddagger}}{R} - \frac{\Delta H^{\ddagger}}{RT}\right) = \frac{k_{\text{ex}}^{298}T}{298,15} \exp\left[\frac{\Delta H^{\ddagger}}{R}\left(\frac{1}{298,15} - \frac{1}{T}\right)\right] \quad (18)$$

kde je:

$k_{\text{B}}$ ...Boltzmannova konstanta

$T$ ...termodynamická teplota

$h$ ...Planckova konstanta

$R$ ...univerzální plynová konstanta

$\Delta S^{\ddagger}$ ...aktivační entropie výměny vody

$\Delta H^{\ddagger}$ ...aktivační enthalpie výměny vody

Místo transverzální relaxační rychlosti  $1/T_2$  je zavedena tzv. redukováná relaxační rychlost  $1/T_{2\text{r}}$ , kterou popisuje rovnice(19)<sup>[40,41]</sup>

$$\frac{1}{T_{2\text{r}}} = \frac{1}{qP_{\text{m}}}\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2,\text{dia}}}\right) = \frac{1}{\tau_{\text{m}} + T_{2\text{m}}} \quad (19)$$

kde je:

$T_{2,\text{dia}}$ ...transverzální relaxační čas referentního diamagnetického komplexu

Rezidenční čas molekuly vody  $\tau_{\text{m}}$  ve vnitřní koordinační sféře lze vypočítat ze závislosti  $1/T_{2\text{r}}$ , resp.  $\ln(1/T_{2\text{r}})$ , na reciproké teplotě. V oblasti nízkých teplot, v oblasti tzv. pomalé kinetiky výměny vody, je relaxační rychlost jader  $^{17}\text{O}$  limitována rychlostí výměny vody  $1/\tau_{\text{m}}$ . Redukovaná relaxační rychlost v této oblasti s teplotou roste. Při vyšších teplotách (po dosažení maxima, v oblasti tzv. rychlé kinetiky výměny vody) redukováná relaxační rychlost klesá. V této oblasti je relaxační rychlost jader  $^{17}\text{O}$  určena relaxační rychlostí vodíkových jader koordinované vody  $1/T_{2\text{m}}$ . Pokud je rychlost výměny vody příliš vysoká i při nízkých teplotách, nelze naměřit oblast pomalé kinetiky a pro přesný výpočet rychlosti výměny vody  $\tau_{\text{m}}$  je nutné určit elektronový relaxační čas  $T_{2\text{e}}$  z jiného experimentu (například z EPR měření) a provést měření relaxačních rychlostí  $^{17}\text{O}$  při různých intenzitách magnetického pole.

### 1.3.2 Stanovení koncentrace komplexů v roztocích

lit.<sup>[14,42,43]</sup>

Při přípravě komplexů lanthanoidů je vzhledem k vysoké hygroskopicitě solí příslušných lanthanoidů obtížné pouze z navážky určit přesnou koncentraci výsledného roztoku. Pro zpřesnění stanovení dané koncentrace paramagnetických komplexů v roztoku slouží tzv. Evansova metoda. Přítomnost paramagnetické látky v roztoku způsobí změnu celkové magnetické susceptibility roztoku, zároveň se změní efektivní magnetické pole uvnitř vzorku a dojde tedy ke změně rezonanční frekvence měřených jader. Změna rezonanční frekvence (respektive indukovaný chemický posun  $\Delta_\chi$ ) se označuje pojmem BMS (Bulk Magnetic Susceptibility) a může být vyjádřena z rovnice (20)

$$\Delta_\chi = \frac{4\pi cs}{T} \left( \frac{\mu_{\text{eff}}}{2,84} \right)^2 \times 10^3 \quad (20)$$

kde je:

$\Delta_\chi$ ...indukovaný chemický posun (ppm)

$c$ ...koncentrace paramagnetického komplexu ( $\text{mol dm}^{-3}$ )

$s$ ...geometrický faktor

$\mu_{\text{eff}}$ ...efektivní magnetický moment pro daný paramagnetický ion (B. M.)

**Tabulka 1:** Hodnoty efektivních magnetických momentů  $\mu_{\text{eff}}$  vybraných  $\text{Ln}^{3+}$  iontů<sup>[14]</sup>.

$\text{Ln}^{3+}$	$\mu_{\text{eff}}$ (B. M.)
Ce <sup>3+</sup>	2,56
Pr <sup>3+</sup>	3,62
Nd <sup>3+</sup>	3,68
Sm <sup>3+</sup>	1,55–1,65
Eu <sup>3+</sup>	3,4–3,51
Gd <sup>3+</sup>	7,94
Tb <sup>3+</sup>	9,7
Dy <sup>3+</sup>	10,6
Ho <sup>3+</sup>	10,6
Er <sup>3+</sup>	9,6
Tm <sup>3+</sup>	7,6
Yb <sup>3+</sup>	4,5

Geometrický faktor  $s$  závisí na tvaru vzorku a na jeho orientaci ve vnějším magnetickém poli.

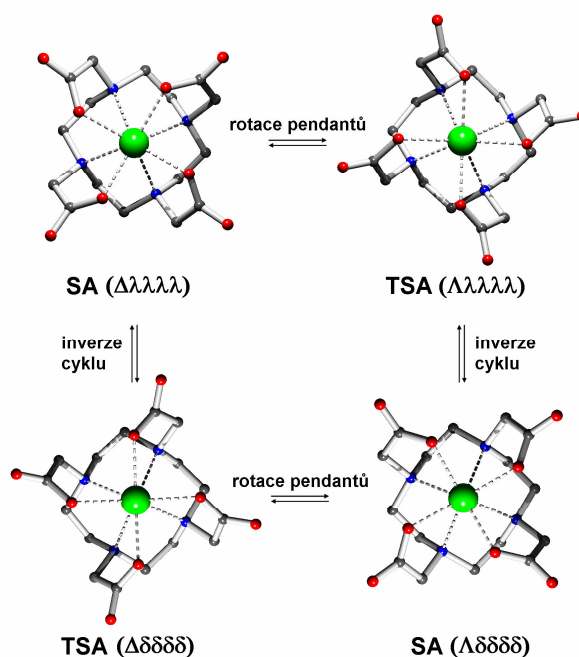
Pro sférický tvar je  $s = 0$ , pro cylindrický tvar umístěný paralelně v magnetickém poli (např. NMR kyveta)  $s = 1/3$ , pro cylindrický tvar umístěný kolmo k magnetickému poli  $s = -1/6$  atd. Hodnoty efektivních magnetických momentů  $\mu_{\text{eff}}$  pro daný paramagnetický ion udává Tabulka 1. Dosazením rozdílu chemického posunu  $t\text{-BuOH}$  v roztoku paramagnetického komplexu a v roztoku externího standardu do vztahu (20) je možné vypočítat koncentraci paramagnetické látky v roztoku.

### 1.3.3 Izomerie komplexů v roztocích

Je známo, že komplexy ligandů typu DOTA mohou existovat ve dvou diastereoizomerních formách. Příčinou vzniku izomerů jsou dva nezávislé zdroje chiralit: 1) koordinované skupiny pendantních ramen mohou být natočeny dvěma různými způsoby  $\Lambda$  nebo  $\Delta$ , 2) díky koordinaci dusíkových atomů makrocyclu se mohou pětičlenné chelátové kruhy vyskytovat ve dvou

konformacích označovaných jako  $\lambda$  a  $\delta$ . Komplexy ligandů typu DOTA tedy mohou tvořit celkem čtyři izomery, které tvoří dva diastereomerní páry enantiomerů ( $\Lambda\delta\delta\delta\delta/\Delta\lambda\lambda\lambda\lambda$  a  $\Lambda\lambda\lambda\lambda\lambda/\Delta\delta\delta\delta\delta$ ). Tyto izomery bývají v roztoku mezi sebou v dynamické rovnováze. Enantiomerní páry jsou metodou NMR spektroskopie nerozlišitelné, diastereoizomery naopak pomocí této metody rozlišitelné a poskytují rozdílná NMR spektra<sup>[44,45]</sup>. Enantiomerní pár  $\Lambda\delta\delta\delta\delta/\Delta\lambda\lambda\lambda\lambda$  se označuje jako **SA** (**S**quare **A**ntiprism), izomerní pár  $\Lambda\lambda\lambda\lambda\lambda/\Delta\delta\delta\delta\delta$  nese označení **TSA** (**T**wisted **S**quare **A**ntiprism). Izomery **SA** a **TSA** bývají někdy označovány písmeny **M** (**M**ajor), resp. **m** (**m**inor), což bylo původní označení zastoupení izomerů v komplexu  $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$  (Obrázek 8).

Izomery **SA** a **TSA** se liší především torzními úhly  $\omega$  rovin  $\text{N}_4$  a  $\text{O}_4$ . Pro izomer **SA** se úhel  $\omega$  blíží teoretické hodnotě  $45^\circ$ , pro izomer **TSA** je hodnota torzního úhlu  $\omega$  blízká teoretické hodnotě  $22,5^\circ$ . Izomery **SA** a **TSA** se liší také velikostí dutiny mezi rovinou dusíkových a kyslíkových atomů. Koordinační dutina **TSA** izomeru je vyšší než dutina izomeru **SA**. Proto zastoupení jednotlivých izomerů v roztoku závisí na iontovém poloměru centrálního atomu (prostornější izomer **TSA** převažuje na začátku lanthanoidové řady, izomer **SA** naopak na jejím konci)<sup>[44]</sup>. Díky flexibilitě **TSA** izomeru dochází u tohoto izomeru až



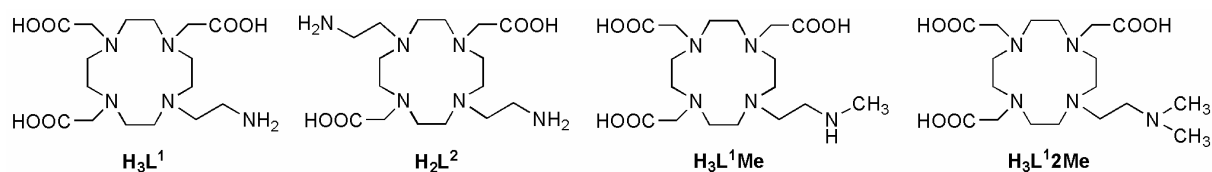
**Obrázek 8:** Strukturní vztahy mezi jednotlivými izomery lanthanoidových komplexů s ligandy typu DOTA. Obrázek byl převzat z lit.<sup>[12]</sup>.

k  $50\times$  rychlejší výměně vody než u izomeru **SA**<sup>[31]</sup> (koordinační místo vody je stéricky bráněno, dochází k rychlé disociaci molekuly vody z první koordinační sféry a poté dojde opět ke koordinaci nové molekuly vody). Jelikož je možné zastoupení izomeru **TSA** modulovat změnou struktury ligandů tvořících komplex (u komplexů ligandů s objemnými pendantními skupinami je preferována izomerie **TSA**), není divu, že v současné době je jeden z přístupů ke zvýšení relaxivity kontrastních látek založen právě na snaze o přípravu takových komplexů, které budou preferovat uspořádání **TSA**.

## 2 MOTIVACE A CÍLE PRÁCE

Prvním cílem této diplomové práce byla syntéza dvou makrocyclických ligandů **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>** a **H<sub>2</sub>L<sup>2</sup>** (Obrázek 9) založených na tetraazacyklododekanovém skeletu s vyměnitelnými labilními protony na koordinujících se aminových skupinách, následné studium acidobazických vlastností těchto ligandů pomocí potenciometrických a NMR titrací a studium konstant stability jejich komplexů s vybranými ionty kovů. Tyto dva modelové ligandy byly vybrány proto, že by po zakomplexování s vhodnými paramagnetickými ionty mohly sloužit jako kontrastní látky typu CEST (resp. PARACEST), čili jako kontrastní látky využívající přenosu saturace. Z tohoto důvodu byla dalším cílem této práce příprava komplexů ligandů **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>** a **H<sub>2</sub>L<sup>2</sup>** s lanthanoidy a následné studium vlastností a efektu CEST těchto komplexů v roztocích.

Pro porovnání efektu CEST komplexů ligandu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>** s komplexy strukturně podobných ligandů byla dalším cílem této práce příprava ligandu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>1Me** s jedním vyměnitelným protonem na koordinující se skupině pendantního ramene, dále příprava ligandu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>2Me** bez vyměnitelného protonu na koordinující se aminové skupině, následná příprava jejich komplexů s lanthanoidy a studium efektu CEST těchto komplexů v roztocích.



**Obrázek 9:** Struktury ligandů připravených a studovaných v rámci této diplomové práce.



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ

K přípravě ligandů a jejich komplexů byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla, jednalo se o produkty firem Fluka, Strem, Lachema, Acros Organics, Bracco, Lach-Ner, Aldrich a Penta. Před použitím nebyly dále čištěny ani sušeny (kromě rozpouštědel MeCN a THF, která byla sušena podle lit.<sup>[46]</sup>). Deionizovaná voda použitá při syntéze ligandů a komplexů byla připravena deionizací vody systémem ROWAPUR 200/100 (PřF UK).

Voda použitá pro potenciometrické titrace byla připravena deionizací vody na iontoměničích Milli-Q (Millipore) na katedře fyzikální chemie PřF UK v Praze. Komerčně dostupný  $\text{NMe}_4\text{Cl}$  (Fluka) byl rekrystalován z horkého *i*-PrOH, pevná sůl byla sušena ve vakuu v exsikátoru nad  $\text{P}_4\text{O}_{10}$ . Roztok  $\text{NMe}_4\text{OH}$  byl připraven z  $\text{NMe}_4\text{Cl}$  za použití deionizované vody prosté  $\text{CO}_2$  iontovou výměnou na koloně naplněné iontoměničem Dowex 1 ( $\text{OH}^-$ -cyklus) pod atmosférou argonu. Roztok  $\text{NMe}_4\text{OH}$  byl standardizován titrací hydrogenftalátu draselného. Roztok  $\text{HCl}$  byl připraven z vodného roztoku  $\text{HCl}$  (extra pure). Takto připravený zásobní roztok byl standardizován roztokem  $\text{NMe}_4\text{OH}$ . Roztoky kovů byly připraveny rozpuštěním chloridu příslušného kovu v deionizované vodě, přesná koncentrace těchto roztoků byla stanovena chelatometricky.

#### *Deuterovaná rozpouštědla pro měření NMR spekter:*

$\text{CDCl}_3$ , 99,95 % D .....Aldrich  
 $\text{D}_2\text{O}$ , 99,8 % D .....Chemotrade

#### *Iontoměniče a sorbenty:*

silný aniontový iontoměnič, Dowex 1, 100–200 mesh.....Fluka  
silný kationtový iontoměnič, Dowex 50, 50–100 mesh .....Fluka  
slabý kationtový iontoměnič, Amberlite 50, 160–200 mesh .....Fluka  
silikagel, Silicagel 60–230 mesh.....Merck

#### *Detekční činidla pro TLC:*

Ninhydrin, 0,5% ethanolický roztok

## 3.2 METODY CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

### 3.2.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Všechna charakterizační 1D NMR ( $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ ) a 2D NMR (HSQC, HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) spektra byla naměřena na spektrometrech VNMRs300, Varian<sup>UNITY</sup> INOVA 400 a Bruker Avance (III) 600. Rezonanční frekvence měřených jader a typ rozpouštědla jsou vždy uvedeny u jednotlivých látek. Hodnoty chemických posunů  $\delta$  jsou uváděny v jednotkách ppm a jsou zaokrouhleny na dvě desetinná místa. Interakční konstanty  $J$  jsou uváděny v jednotkách Hz a jsou zaokrouhleny na jedno desetinné místo. Všechna  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla naměřena s „decouplingem“ vodíkových jader. Není-li uvedeno jinak, probíhalo měření při teplotě 25 °C.

Chemické posuny v  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR charakterizačních spektrech byly referencovány na interní standardy: *t*-BuOH při měření v  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\delta_{\text{H}} = 1,25$ ,  $\delta_{\text{C}} = 30,29$ ), TMS při měření v  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{H}} = 0,00$ ,  $\delta_{\text{C}} = 0,00$ ), nebo na píky rozpouštědla: HDO ( $\delta_{\text{H}} = 4,8$ ) a  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{C}} = 77,00$ ). Zkratky pro multiplicitu signálů v NMR spektrech jsou: s (singlet), t (triplet), m (multiplet), br (broad).

### 3.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla naměřena na hmotnostním spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 ES-iontrap s ionizací elektrosprejem (detekce v pozitivním i negativním modu). Vzorky byly rozpuštěny v  $\text{H}_2\text{O}$  nebo v MeOH a naředěny mobilní fází (MeCN nebo MeOH). U charakterizací jednotlivých látek jsou uvedeny jen intenzivní signály, které se podařilo interpretovat.

### 3.2.3 Elementární analýza

Elementární analýza byla provedena na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze na analyzátoru Perkin Elmer 2400. Stanoveny byly hmotnostní obsahy prvků: C, H, N, Cl a Br. Hmotnostní procenta jsou uváděna na dvě desetinná místa.

### 3.2.4 Rentgenostrukturní analýza

Rentgenostrukturní analýza byla provedena na přístroji ApexII (čtyřkruhový difraktometr s plošným CCD detektorem, rozlišení 4000×4000 pixelů). Zdrojem RTG záření byla molybdenová anoda s grafitovým monochromátorem (vlnová délka  $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ). Řešení struktur bylo provedeno v programu SIR92<sup>[47]</sup>, vypřesňování struktur bylo provedeno v programu SHELX97<sup>[48]</sup>. Struktury byly vizualizovány pomocí programu Platon<sup>[49]</sup>.

### 3.2.5 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie byla provedena na destičkách Silufol® s širokoporézním silikagelem (Silpearl s luminiscenčním indikátorem pro UV) naneseným na hliníkové fólii (Kavalier). Detekce byla prováděna ninhydrinem nebo pomocí UV lampy. Použité mobilní fáze a způsob detekce jsou vždy uvedeny u jednotlivých látek. Hodnoty  $R_f$  jsou uváděny na dvě desetinná místa.

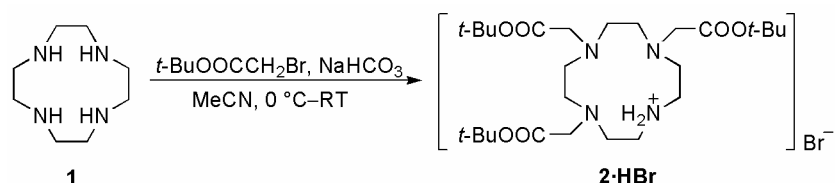
### 3.2.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Analýza meziprojektu **6** byla provedena na HPLC systému, který se skládal z gradientní pumpy Beta 10 (ECOM) se směšovačem Knauer A0285 a z duálního UV detektoru (ECOM). Analýza byla provedena na koloně LunaPHC8 (150×4,6 mm, Phenomenex, průtoková rychlost 1 ml min<sup>-1</sup>). Mobilní fáze byla odplynována degaserem DG 3014 (ECOM) a míchána ze zásobních roztoků. Detekce probíhala při 210 a 254 nm. Objem vzorku injektovaného do HPLC systému byl 20 µl (koncentrace přibližně 1 mg ml<sup>-1</sup>).

Preparace meziprojektu **6** byla provedena na HPLC systému, který se skládal z gradientní pumpy LCD 50K (ECOM) a z UV-Vis detektoru LCD 2083 (ECOM). Preparace byla provedena na koloně LunaPHC8 (250×21,1 mm, Phenomenex, průtoková rychlost 20 ml min<sup>-1</sup>). Detekce probíhala při 210 nm. Mobilní fáze byly připraveny zvlášť a odplyněny ultrazvukovou sondou (Cole-Parmer 750-Watt Ultrasonic Homogenizer). Objem vzorku injektovaného do HPLC systému byl 1 ml. Sběr dat a jejich zpracování bylo provedeno programem Clarity (DataApex).

### 3.3 SYNTETICKÁ ČÁST

#### 3.3.1 1,4,7-tris(*t*-butylkarboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (**2·HBr**)



Reakce byla provedena podle postupu uvedeného v lit.<sup>[50]</sup>. V 1000ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo suspendováno 15,0 g cyklenu **1** (87 mmol) a 30,1 g (358 mmol, 4,1 ekv.) NaHCO<sub>3</sub> v 500 ml bezvodého MeCN. Baňka byla uzavřena plastovou zátkou a umístěna do lázně voda/led. Reakční směs byla vychlazena na teplotu 0 °C. Následně bylo do reakční směsi z přikapávací nálevky za intenzivního míchání během 2 hodin přikapáno 52,7 g *t*-butylbromacetátu (270 mmol, 3,1 ekv.). Během přikapávání byla reakční směs stále chlazena v ledové lázni. Poté byla reakční směs míchána při laboratorní teplotě 24 hodin. Reakční směs byla přefiltrována a filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl poté triturován 500 ml toluenu mícháním při laboratorní teplotě po dobu 30 hodin. Produkt, který se v toluenu nerozpustil, byl odsát na fritě S3, promyt 3 × 50 ml toluenu a vysušen prosátím vzduchu. Poté byl tento bílý prášek vnesen do 1000ml baňky a rozpuštěn ve 400 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Následně bylo do baňky přidáno 400 ml destilované vody. Obsah baňky byl intenzivně míchán při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin a poté převeden do 1000ml dělicí nálevky. Organická fáze byla oddělena od vodné fáze, vodná fáze byla extrahována 3 × 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organické fáze byly spojeny, vysušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrovány a zahuštěny na rotační vakuové odparce přibližně na objem 50 ml. (Vodná fáze byla odpařena na rotační vakuové odparce a zachována pro pozdější zpracování.) K tomuto koncentrovanému roztoku byl pomalu za míchání přidáván 1-hexan do vzniku bílého zákalu, poté byla baňka umístěna do lednice. Během 30 minut v baňce vykrystalovaly bílé drobné krystaly produktu **2·HBr**. Krystalky byly odsáty na fritě S2, promyty směsí hexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:2) a vysušeny prosátím vzduchu. Matečný roztok byl dán do lednice, po 30 minutách byla izolována druhá frakce bílých drobných krystalků produktu **2·HBr**. Obě frakce byly dosušeny *in vacuo*. Bylo připraveno 20,24 g (39 %) látky **2·HBr** v podobě bílého lehkého prášku.

#### Charakterizace:

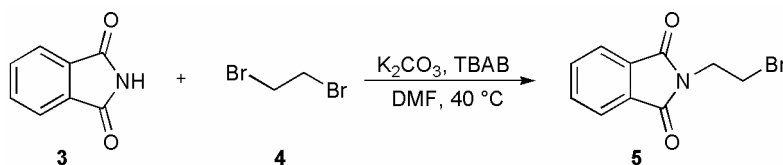
<sup>1</sup>H NMR (600,2 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,46 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,47 (18H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2,88 (4H, br, CH<sub>2</sub>); 2,94 (8H, br, CH<sub>2</sub>); 3,11 (4H, br, CH<sub>2</sub>); 3,30 (2H, s, CH<sub>2</sub>CO); 3,38 (4H, s, CH<sub>2</sub>CO).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (150,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  28,20 (6C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 28,24 (3C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 47,53 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 48,86 (1C,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ); 49,23 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 51,29 (2C,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ); 51,37 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 58,21 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 81,68 (1C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 81,84 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 169,64 (1C,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ); 170,53 (2C,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

MS-ESI: (+): 515,3 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , vypočteno 515,4).

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{51}\text{BrN}_4\text{O}_6$ ,  $M_r = 595,6$ ) C: 52,62 (52,43), H: 8,58 (8,63), N: 9,32 (9,41), Br: 13,94 (13,42).

### 3.3.2 *N*-(2-bromethyl)ftalimid (**5**)



Reakce byla provedena kombinací postupů uvedených v lit.<sup>[51]</sup>. Ve 100ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo suspendováno 9,4 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (68 mmol, 2 ekv.) ve směsi 20 ml DMF, 25 ml 1,2-dibromethanu **4** (136 mmol, 4 ekv.) a 0,7 g TBAB. Poté bylo za míchání postupně přidáno 5,0 g ftalimidu **3** (34 mmol). Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni vyhřáté na 40 °C po dobu 18 hodin. Poté byla reakční směs zředěna asi 150 ml vody. Dále bylo přidáno 25 ml ethylacetátu. Poté byla směs převedena do 250ml dělicí nálevky a důkladně protřepána. Organická fáze ethylacetátu byla oddělena. Vodná fáze byla reextrahována 3× 25 ml ethylacetátu. Organické extrakty byly spojeny a protřepány 3× 25 ml vody. Organická fáze byla poté odpařena na rotační vakuové odparce, odparek byl rozpuštěn v malém množství horkého EtOH a ponechán k volné krystalizaci. Vyloučené bílé krystalky produktu **5** byly odsáty na fritě S2. Bylo získáno 5,25 g produktu **5** (61 %). Matečný roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce, odparek byl poté rozpuštěn v malém množství horkého EtOH a ponechán k volné krystalizaci. Poté bylo izolováno dalších 2,35 g (27 %) produktu **5**. Celkem bylo izolováno 7,6 g (88 %) látky **5**.

#### Charakterizace:

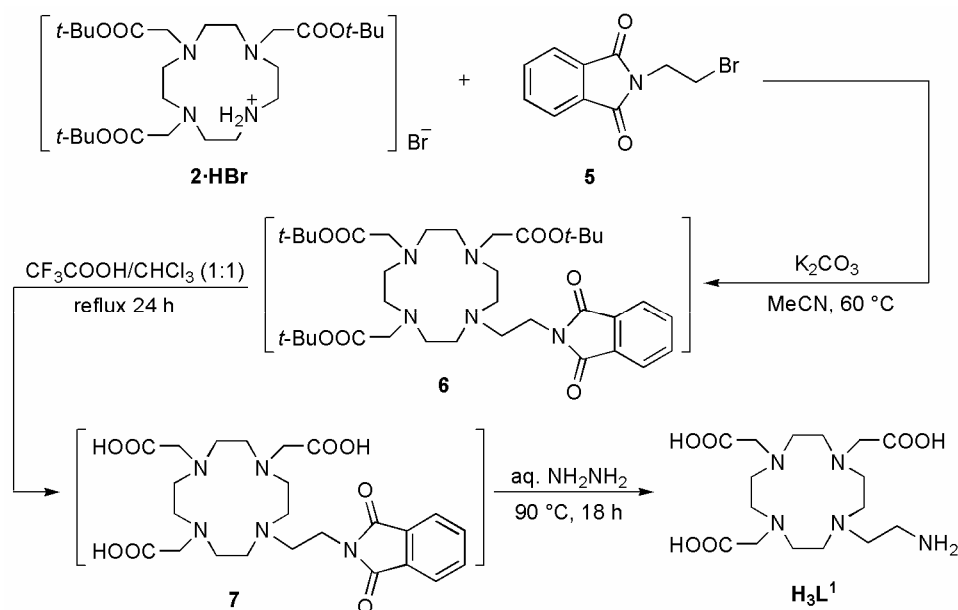
TLC: Silufol® - Kavalier,  $\text{CHCl}_3$ :MeOH-9:1, detekce UV,  $R_f = 0,83$ .

$^1\text{H}$  NMR (299,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3,59 (2H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,6$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ); 4,09 (2H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,6$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ); 7,70–7,73 (2H, m, arom.); 7,84–7,86 (2H, m, arom.).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  28,55 (1C,  $\text{BrCH}_2$ ); 39,70 (1C,  $\text{BrCH}_2\text{CH}_2$ ); 123,93 (2C, arom.); 132,23 (2C, arom. kvartérní); 134,63 (2C, arom.); 168,22 (2C, CO).

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{BrNO}_2$ ,  $M_r = 254,1$ ) C: 47,68 (47,27), H: 3,07 (3,17), N: 5,32 (5,51), Br: 31,15 (31,45).

### 3.3.3 1,4,7-tris(karboxymethyl)-10-(2-aminoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan ( $H_3L^1 \cdot 3,5H_2O$ )



Příprava meziproduktu **6** *in situ* byla provedena podle lit.<sup>[52]</sup>. Ve 100ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem opatřené shora chlorkalciovou trubičkou bylo suspendováno 2,40 g  $K_2CO_3$  (17,4 mmol, 4 ekv.) ve směsi 40 ml bezvodého MeCN a 2,6 g **2-HBr** (4,36 mmol). Poté bylo za míchání postupně přidáno 1,22 g látky **5** (4,80 mmol, 1,1 ekv.). Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni vyhřáté na 60 °C po dobu 24 hodin. Poté byla reakční směs analyzována pomocí TLC a hmotnostní spektrometrie. Přítomnost produktu **6** v reakční směsi byla hmotnostní spektrometrií potvrzena. Následně byla reakční směs přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce. Nažloutlý olej byl rozpuštěn ve 20 ml  $CHCl_3$  a protřepán 4× 7 ml  $H_2O$ . Organická fáze byla vysušena bezvodým  $Na_2SO_4$ , přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce. Bylo získáno 3,40 g nažloutlého oleje obsahujícího látku **6**. Pro účely charakterizace pomocí  $^1H$  a  $^{13}C\{^1H\}$  NMR byl vzorek látky **6** přečištěn na semipreparativní koloně LunaPHC8 (250×21,1 mm, Phenomenex, průtoková rychlost 20 ml  $min^{-1}$ ). Detekce při 210 nm. Složka: A =  $CH_3CN$ , B = 0,1% roztok  $CF_3COOH$  v  $H_2O$ , C =  $H_2O$ ; složka C byla vždy dopočtena do 100 %. Gradient eluce: A: 20–50 %, 0–24 min; 50 %, 24–40 min; 50–20 %, 40–41 min; 20 %, 41–61 min. B: 20 %, 0–61 min.  $t_R = 17,0$  min.

Navážka 3,40 g oleje obsahujícího látku **6** byla rozpuštěna v 50ml baňce ve směsi 15 ml  $CF_3COOH$  a 15 ml  $CHCl_3$ . Reakční směs byla zahřívána k varu na olejové lázni vyhřáté na 80 °C po dobu 24 hodin. Poté byl roztok odpařen dosucha na rotační vakuové odparce. Následně byl odparek rozpuštěn v malém množství destilované vody a roztok byl znovu odpařen na rotační vakuové odparce. Tento postup byl ještě 2× zopakován. Poté byl odparek rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a přečištěn sloupcovou chromatografií na silném

kationtovém iontoměníči (Dowex 50, 50–100 mesh,  $H^+$ -cyklus,  $2 \times 9$  cm). Kyselé nečistoty byly odstraněny promýváním  $H_2O$ . Produkt **7** byl eluován 5% aq.  $NH_3$ . Poté byly eluáty zahuštěny, jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí TLC a frakce obsahující produkt **7** byly spojeny. Bylo získáno 2,8 g nažloutlého oleje obsahujícího látku **7**.

Olej obsahující látku **7** (2,8 g) byl rozpuštěn v 50 ml baňce v 15 ml 80% aq.  $NH_2NH_2 \cdot H_2O$ . Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni vyhřáté na  $90^\circ C$  po dobu 18 hodin. Poté byla reakční směs analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie. Přítomnost produktu  $H_3L^1$  v reakční směsi byla touto metodou potvrzena. Poté byl roztok odpařen dosucha na rotační vakuové odparce a odparek byl rozpuštěn v malém množství vody. Roztok byl poté přefiltrován a znovu odpařen na rotační vakuové odparce (tento postup byl  $2 \times$  zopakován). Poté byl odparek rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a přečištěn sloupcovou chromatografií na silném aniontovém iontoměníči (Dowex 1,  $OH^-$ -cyklus,  $1,25 \times 8$  cm). Nečistoty byly odstraněny promýváním  $H_2O$ . Produkt  $H_3L^1$  byl eluován 5% aq.  $CH_3COOH$ . Poté byly eluáty zahuštěny, analyzovány pomocí TLC a frakce obsahující produkt  $H_3L^1$  byly spojeny. Bylo získáno 1,5 g látky  $H_3L^1$  ve formě nažloutlého oleje. Olej látky  $H_3L^1$  byl rozpuštěn v malém množství EtOH. Po několika minutách se v baňce začaly tvořit drobné bílé krystalky látky  $H_3L^1$ . Bylo izolováno 0,77 g (39 %; vztaženo k množství použité látky **2-HBr**) ligandu  $H_3L^1 \cdot 3,5H_2O$  v podobě jemného bílého prášku.

#### Charakterizace:

##### Látka **6**

TLC: Silufol<sup>®</sup> - Kavalier, 20% AcOH, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,46$

Silufol<sup>®</sup> - Kavalier, IPAV-5:1:1, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,75$ .

$^1H$  NMR (299,9 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  1,45–1,48 (27H, m,  $C(CH_3)_3$ ); 3,15–3,43 (18H, m,  $CH_2$ ); 3,53 (4H, s,  $CH_2COO$ ); 3,86 (2H, s,  $CH_2COO$ ); 4,02 (2H, br,  $CH_2$ ); 7,73–7,76 (2H, m, arom.); 7,84–7,87 (2H, m, arom.).

$^{13}C\{^1H\}$  NMR (150,9 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  27,92 (9C,  $C(CH_3)_3$ ); 32,58, 48,97, 49,92, 50,13, 51,17, 51,86, 54,77 (13C,  $CH_2$ ); 82,96 (2C,  $C(CH_3)_3$ ); 84,28 (1C,  $C(CH_3)_3$ ); 123,58 (2C, arom.); 131,65 (2C, arom. kvartérní); 134,37 (2C, arom.); 167,85 (3C,  $CH_2CO_2$ ); 169,22 (2C, NCO).

MS-ESI: (+): 688,5 ( $[M+H]^+$ , vypočteno 688,4); 710,4 ( $[M+Na]^+$ ; vypočteno 710,4).

##### Látka **7**

TLC: Silufol<sup>®</sup> - Kavalier, IPAV-7:3:3, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,42$ .

Silufol<sup>®</sup> - Kavalier, IPOV-6:1:8, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,27$ .

MS-ESI: (–): 518,0 ( $[M-H]^-$ , vypočteno 518,2).

### Látka **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>·3,5H<sub>2</sub>O**

TLC: Silufol® - Kavalier, IPAV-7:3:3, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,38$

Silufol® - Kavalier, IPOV-6:1:8, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,21$ .

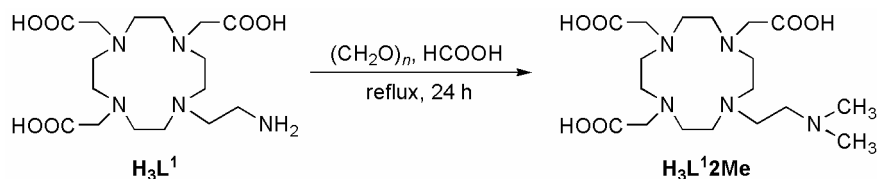
<sup>1</sup>H NMR (600,2 MHz, D<sub>2</sub>O): 2,85–2,89 (4H, m, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO); 2,94 (2H, br, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 3,02–3,04 (4H, m, CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 3,06 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,1, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 3,13 (2H, s, CH<sub>2</sub>CO); 3,33–3,37 (2H, m, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO); 3,40–3,45 (2H, m, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO); 3,54–3,58 (2H, m, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO); 3,71–3,77 (2H, m, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO); 3,90 (4H, s, CH<sub>2</sub>CO).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150,9 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 37,01 (1C, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 48,90 (2C, CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 48,99 (2C, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO); 50,82 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 51,00 (2C, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO); 53,06 (2C, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO); 55,85 (1C, CH<sub>2</sub>CO); 58,07 (2C, CH<sub>2</sub>CO); 171,02 (2C, CH<sub>2</sub>CO); 178,77 (1C, CH<sub>2</sub>CO).

MS-ESI: (+): 412,0 ([M+Na]<sup>+</sup>, vypočteno 412,2); 428,0 ([M+K]<sup>+</sup>, vypočteno 428,2). (–): 425,8 ([M+K–2H]<sup>–</sup>, vypočteno 426,2).

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>38</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9,5</sub>,  $M_r = 452,5$ ) C: 42,64 (42,47), H: 8,54 (8,46), N: 15,52 (15,48).

### 3.3.4 1,4,7-tris(karboxymethyl)-10-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl]- -1,4,7,10-tetraazacyklododekan (**H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>2Me**)



Ve 25ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo rozpuštěno 100 mg **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>·3,5H<sub>2</sub>O** (0,221 mmol) v 10 ml 10% HCOOH. Následně bylo přidáno 26,53 mg (0,884 mmol, 4 ekv.) paraformaldehydu. Reakční směs byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 5 h. Poté byla provedena analýza reakční směsi pomocí <sup>1</sup>H NMR (vzorek reakční směsi byl přefiltrován a odpařen na rotační vakuové odparce), přítomnost produktu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>2Me** v reakční směsi byla touto metodou potvrzena, konverze ale nebyla 100%, proto bylo do reakční směsi opět přidáno 26,53 mg (0,884 mmol, 4 ekv.) paraformaldehydu a reakční směs byla po dobu 5 h pod zpětným chladičem zahřívána k varu. Tento postup byl poté ještě jednou zopakován. Po 9 hodinách byla reakční směs přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml destilované vody a znovu odpařen. Tento postup byl ještě 3× zopakován. Bylo získáno 92 mg látky **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>2Me** ve formě nažloutlého oleje.

#### Charakterizace:

<sup>1</sup>H NMR (600,2 MHz, D<sub>2</sub>O, pD = 4,8): δ 2,87–2,90 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 2,93 (6H, s, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,96 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,0 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3,05–3,08 (4H, m, CH<sub>2</sub>); 3,13–3,17 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 3,27 (2H,

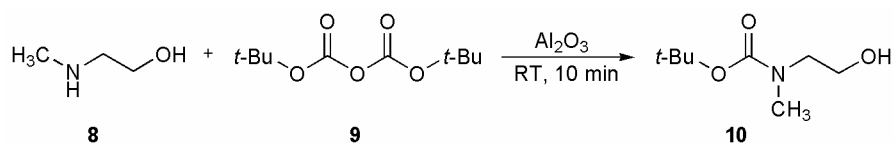


t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 3,36 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 3,38–3,40 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 3,47–3,56 (6H, m,  $\text{CH}_2$ ); 3,88 (4H, br s,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (150,9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 4,8):  $\delta$  44,32 (2C,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 48,08 (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 48,70 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 49,14 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 51,32 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 52,68 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 55,63 (1C,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 56,08 (1C,  $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 57,49 (2C,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 170,51 (2C,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 177,96 (1C,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ).

MS-ESI: (+): 456,9 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , vypočteno 456,2), 478,8 ( $[\text{M}+\text{K}+\text{Na}-\text{H}]^+$ , vypočteno 478,2).

### 3.3.5 2-[*N*-(*t*-butyloxykarbonyl)-*N*-methylamino]ethanol (**10**)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.<sup>[53]</sup>. Do 100ml baňky s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo vneseno 3,10 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (30 mmol), následně bylo přidáno 1,50 g (20 mmol) látky **8**. Poté bylo do reakční směsi přidáno 4,80 g (22 mmol, 1,1 ekv.) látky **9**. Reakční směs byla intenzivně míchána 10 minut. Poté byla reakční směs extrahována  $2 \times 70$  ml ethylacetátu, přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce. Bylo získáno 3,1 g látky **10** ve formě oleje.

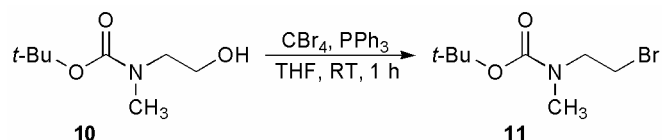
#### Charakterizace:

$^1\text{H}$  NMR (299,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,39 (9H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 2,85 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ ); 3,31 (2H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ ,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 3,66 (2H, br t,  $\text{CH}_2\text{O}$ ).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  28,32 (3C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 35,38 (1C,  $\text{NCH}_3$ ); 51,30 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 61,32 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 79,80 (1C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 157,28 (1C, CO).

MS-ESI: (+): 198,4 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , vypočteno 198,1).

### 3.3.6 2-[*N*-(*t*-butyloxykarbonyl)-*N*-methylamino]bromethan (**11**)

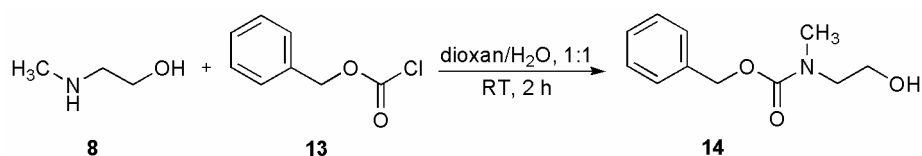


Reakce byla provedena podle postupu v lit.<sup>[53]</sup>. Do suché 100ml baňky s kulatým dnem a magnetickým míchadlem opatřené shora chlorkalciovou trubičkou bylo vneseno 1,00 g látky **10** (5,68 mmol), následně bylo přidáno 25 ml bezvodého THF. Roztok byl umístěn na magnetickou míchačku a baňka byla obalena alobalem. Za intenzivního míchání bylo do reakční směsi přidáno 2,83 g (8,55 mmol, 1,5 ekv.)  $\text{CBr}_4$  a 2,24 g (8,55 mmol, 1,5 ekv.)  $\text{PPh}_3$ . Reakční směs byla



**Charakterizace:**

MS-ESI: (+): 673,1 ( $[M+H]^+$ , vypočteno 672,5).

**3.3.8 2-[N-(benzyloxykarbonyl)-N-methylamino]ethanol (14)**

Ve 100ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo rozpuštěno 2,64 g (35,2 mmol, 4 ekv.) látky **8** ve směsi 15 ml dioxanu a 15 ml H<sub>2</sub>O. Poté bylo do reakční směsi přikapáno 1,5 g (8,8 mmol) látky **13**, tj. **Z-Cl**. Reakční směs byla intenzivně míchána po dobu 2 hodin. Poté byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn ve 30 ml toluenu a extrahován 5× 15 ml H<sub>2</sub>O a 2× 3% vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce. Bylo získáno 1,19 g látky **14** ve formě oleje.

**Charakterizace:**

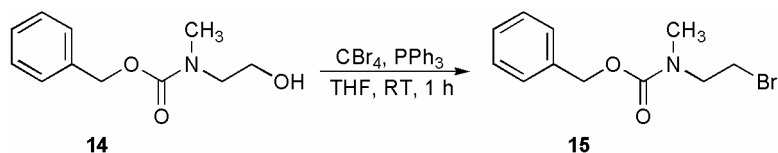
TLC: Silufol® - Kavalier, IPOV-7:3:3, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,44$

Silufol® - Kavalier, 20% AcOH, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,42$ .

<sup>1</sup>H NMR (299,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  2,99 (3H, s, NCH<sub>3</sub>); 3,44 (2H, br, CH<sub>2</sub>); 3,75 (2H, br, CH<sub>2</sub>); 5,12 (2H, s, OCH<sub>2</sub>Ph); 7,28–7,35 (5H, m, arom.).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (75,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  35,35 (1C, NCH<sub>3</sub>); 51,97 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 61,38 (1C, CH<sub>2</sub>OH); 67,33 (1C, OCH<sub>2</sub>Ph); 127,86, 128,02, 128,49 (5C, arom.); 136,59 (1C, arom. kvartérní); 157,69 (1C, CO).

MS-ESI: (+): 232,5 ( $[M+Na]^+$ , vypočteno 232,1).

**3.3.9 2-[N-(benzyloxykarbonyl)-N-methylamino]bromethan (15)**

Do suché 100ml baňky s kulatým dnem a magnetickým míchadlem opatřené shora chlorkalciovou trubičkou bylo vneseno 1,19 g látky **14** (5,66 mmol), následně bylo přidáno 30 ml bezvodého THF. Za intenzivního míchání bylo do reakční směsi přidáno 2,82 g (8,49 mmol, 1,5 ekv.) CBr<sub>4</sub> a 2,23 g (8,49 mmol, 1,5 ekv.) PPh<sub>3</sub>. Reakční směs byla intenzivně míchána 1 hodinu. Poté byla reakční směs přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek

byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (20×3,5 cm, eluce CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, poté aceton/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9). Přítomnost látky **15** v eluátech byla sledována pomocí TLC. Celkem bylo získáno 1,27 g látky **15** ve formě oleje.

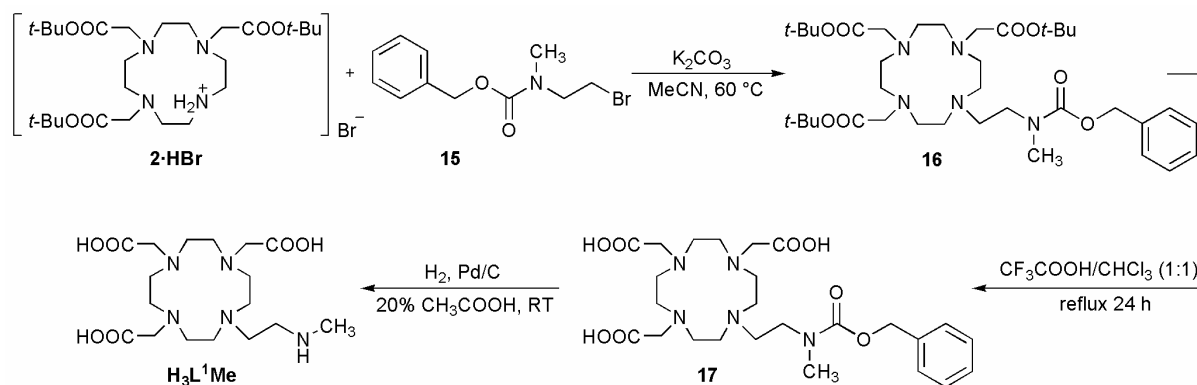
#### Charakterizace:

TLC: Silufol® - Kavalier, 20% AcOH, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,32$ .

<sup>1</sup>H NMR (299,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3,02 (3H, s, NCH<sub>3</sub>); 3,39–3,59 (2H, m, CH<sub>2</sub>N); 3,66 (2H, m, CH<sub>2</sub>Br); 5,15 (2H, s, OCH<sub>2</sub>Ph); 7,31–7,37 (5H, m, arom.).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (75,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 29,10 (1C, CH<sub>2</sub>Br); 35,50 (1C, NCH<sub>3</sub>); 51,19 (1C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br), 67,28 (1C, OCH<sub>2</sub>Ph); 127,86, 128,01, 128,47 (5C, arom.); 136,53 (1C, arom. kvartérní); 156,14 (1C, CO).

#### 3.3.10 1,4,7-tris(karboxymethyl)-10-[2-(*N*-methylamino)ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (**H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>Me**)



V 50ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem opatřené shora chlorkalciovou trubičkou bylo suspendováno 2,00 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (14,4 mmol, 5 ekv.) ve směsi 25 ml bezvodého MeCN a 1,72 g **2·HBr** (2,89 mmol). Poté byl za míchání postupně přikapán roztok 0,943 g látky **15** (3,46 mmol, 1,2 ekv.) v 10 ml bezvodého MeCN. Reakční směs byla po dobu 24 hodin zahřívána na olejové lázni vyhřáté na 60 °C. Poté byla reakční směs analyzována pomocí TLC a hmotnostní spektrometrie. Přítomnost produktu **16** v reakční směsi byla metodou hmotnostní spektrometrie potvrzena. Reakční směs byla přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce. Olej byl rozpuštěn v 15 ml CHCl<sub>3</sub> a protřepán 4× 10 ml H<sub>2</sub>O. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce. Bylo získáno 2,38 g oleje obsahujícího látku **16**.

Navážka 0,70 g oleje obsahujícího látku **16** byla rozpuštěna ve 25ml baňce ve směsi 10 ml CF<sub>3</sub>COOH a 10 ml CHCl<sub>3</sub>. Reakční směs byla zahřívána k varu na olejové lázni vyhřáté na 80 °C po dobu 24 hodin. Poté byl roztok odpařen dosucha na rotační vakuové odparce. Následně byl

odparek rozpuštěn v malém množství destilované vody a roztok byl znovu odpařen na rotační vakuové odparce. Tento postup byl ještě 2× zopakován. Poté byl odparek rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a přečištěn sloupcovou chromatografií na silném kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50–100 mesh, H<sup>+</sup>-cyklus, 1×10 cm). Kyselé nečistoty byly odstraněny promýváním H<sub>2</sub>O. Produkt **17** byl eluován 5% aq. NH<sub>3</sub>. Poté byly eluáty zahuštěny, jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí TLC a frakce obsahující produkt **17** byly spojeny. Bylo získáno 360 mg nažloutlého oleje obsahujícího látku **17**.

Ve 100ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo rozpuštěno 360 mg oleje obsahujícího látku **17** v 60 ml 20% aq. CH<sub>3</sub>COOH. Následně bylo do roztoku přidáno 70 mg katalyzátoru Pd/C (cca. 20 hm. %; obsah paladia 10 %). Reakční směs byla intenzivně míchána 2 dny pod vodíkovou atmosférou. Poté byla reakční směs přefiltrována a roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a nanesen na sloupec silného kationtového iontoměniče (Dowex 50, 50–100 mesh, H<sup>+</sup>-cyklus, 1×5 cm). Kolona byla nejprve promyta H<sub>2</sub>O, produkt **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>Me** byl poté eluován 5% aq. NH<sub>3</sub>. Eluát byl zahuštěn na rotační vakuové odparce a přečištěn na slabém kationtovém iontoměniči (Amberlite 50, 160–200 mesh, H<sup>+</sup>-cyklus, 1,5×5 cm). Nečistoty byly odstraněny promýváním vodou, produkt **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>Me** byl poté eluován 3% aq. HCl. Bylo izolováno 136 mg ligandu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>Me** v podobě hnědého oleje.

### Charakterizace:

#### Látka **21**

TLC: Silufo<sup>®</sup> - Kavalier, IPAV-5:1:1, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,78$ .

MS-ESI: (+): 707,1 ([M+H]<sup>+</sup>, vypočteno 707,5); 728,5 ([M+Na]<sup>+</sup>, vypočteno 728,5).

#### Látka **22**

TLC: Silufo<sup>®</sup> - Kavalier, IPAV-7:3:3, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,33$ .

MS-ESI: (–): 536,2 ([M–H]<sup>–</sup>, vypočteno 536,3).

#### Látka **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>Me**

TLC: Silufo<sup>®</sup> - Kavalier, IPAV-7:3:3, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,55$ .

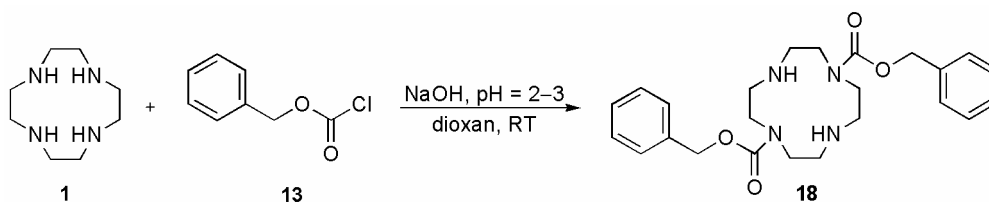
<sup>1</sup>H NMR (299,9 MHz, D<sub>2</sub>O, pD = 1,15): δ 2,63 (3H, s, NCH<sub>3</sub>); 2,80–3,15 (12H, m, CH<sub>2</sub>); 3,20–3,63 (10H, m, CH<sub>2</sub>); 3,97 (4H, br, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (299,9 MHz, D<sub>2</sub>O, pD = 5,6): δ 2,77 (3H, s, NCH<sub>3</sub>); 2,82–2,86 (4H, m, CH<sub>2</sub>); 2,95–3,06 (8H, m, CH<sub>2</sub>); 3,11 (2H, s, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>); 3,25–3,44 (4H, m, CH<sub>2</sub>); 3,51–3,57 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 3,69–3,76 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 3,89 (4H, br s, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (150,9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 5,6):  $\delta$  34,85 (1C,  $\text{NCH}_3$ ); 46,85 (1C,  $\text{CH}_2\text{NCH}_3$ ); 48,79 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 48,93 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 50,30 (1C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_3$ ); 50,96 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 53,01 (2C,  $\text{CH}_2$ ); 55,69 (1C,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 58,05 (2C,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 171,09 (2C,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 178,74 (1C,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ).

MS-ESI: (+): 404,8 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , vypočteno 404,2); 426,9 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , vypočteno 426,2); 442,8 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , vypočteno 442,2).

### 3.3.11 1,7-bis(benzyloxykarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (18)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.<sup>[54]</sup>. Ve 250ml trojhrdlé baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo rozpuštěno 4,00 g cyklu **1** (23,22 mmol) ve 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Následně bylo pomocí 5M HCl upraveno pH roztoku na hodnotu 3. Poté bylo do roztoku přidáno 25 ml dioxanu. Dvě hrdla baňky byla uzavřena septy, přes třetí hrdlo byla do roztoku ponořena pH-elektroda a hrdlo baňky bylo omotáno parafilmem. Následně byl z injekční stříkačky do reakční směsi během 7 hodin pomalu přikapán roztok 10,24 g látky **13**, tj. **Z-Cl** (60,03 mmol, 2,6 ekv.) ve 25 ml dioxanu, pH roztoku bylo neustále upravováno na hodnotu 2–3 pomocí 2M roztoku NaOH. Po přidání veškerého **Z-Cl** byla reakční směs míchána 1 h a poté byla odpařena na rotační vakuové odparce, odparek byl v baňce extrahován  $4 \times 50$  ml  $\text{Et}_2\text{O}$  (organická fáze byla odpařena a ponechána k dalšímu použití). Ke zbylému odparku bylo přilito 40 ml 25% roztoku NaOH, roztok byl poté extrahován  $4 \times 50$  ml  $\text{Et}_2\text{O}$ , organické fáze byly spojeny a promyty  $2 \times 40$  ml 5% roztoku NaOH. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem hořečnatým, přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl dosušen *in vacuo*. Bylo připraveno 7,14 g látky **18** v podobě nažloutlého oleje.

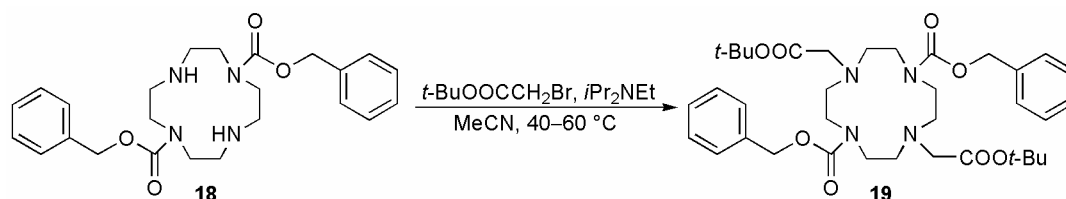
#### Charakterizace:

$^1\text{H}$  NMR (299,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,85 (8H, br,  $\text{NCH}_2$ ); 3,42 (8H, br,  $\text{NCH}_2$ ); 5,13 (4H, s,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ); 7,33 (10H, m, arom.).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  48,38 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 48,66 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 49,29 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 49,73 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 50,38 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 50,82 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 50,87 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 51,27 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 67,28 (2C,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ); 127,93 (4C, arom.); 128,12 (2C, arom.); 128,65 (4C, arom.); 136,79 (2C, arom. kvartérní); 156,94 (2C,  $\text{NCO}_2$ ).

MS-ESI: (+): 441,1 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , vypočteno 441,3).

### 3.3.12 1,7-bis(benzyloxykarbonyl)-4,10-bis(*t*-butylkarboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (19)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.<sup>[54]</sup>. Ve 250ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo rozpuštěno 7,13 g látky **18** (16,18 mmol) v 60 ml bezvodého MeCN. Následně bylo do roztoku přikapáno 4,61 g diisopropylethylaminu (35,67 mmol, 2,2 ekv.) ve 20 ml suchého MeCN a 6,51 g *t*-butylbromacetátu (33,38 mmol, 2,06 ekv.) ve 20 ml suchého MeCN. Reakční směs byla míchána při 40 °C po dobu 18 hodin a při 60 °C po dobu 5 hodin. Poté byl roztok odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v 80 ml Et<sub>2</sub>O a v 50 ml H<sub>2</sub>O. Organická fáze byla promyta 2× 40 ml H<sub>2</sub>O, 40 ml 5% vodného roztoku NaOH a znovu 2× 40 ml H<sub>2</sub>O. Organická fáze byla vysušena pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrována a odpařena. Odparek byl dosušen *in vacuo*. Bylo připraveno 10,03 g látky **19** v podobě nažloutlého oleje.

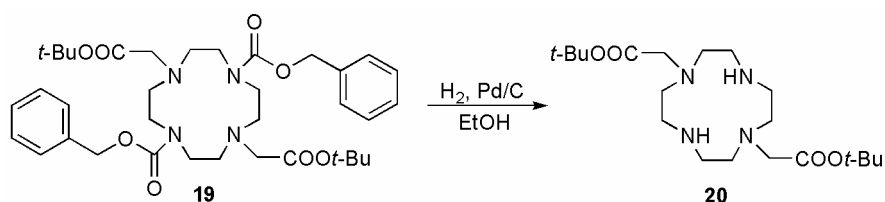
#### Charakterizace:

<sup>1</sup>H NMR (299,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,42 (18H, s, CH<sub>3</sub>); 2,86 (8H, br, NCH<sub>2</sub>); 3,31 (4H, br, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>); 3,41 (8H, br, NCH<sub>2</sub>); 5,11 (4H, s, OCH<sub>2</sub>Ph); 7,33 (10H, m, arom.).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (75,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 28,19 (6C, CH<sub>3</sub>); 47,05 (4C, CH<sub>2</sub>); 54,41 (4C, CH<sub>2</sub>); 56,06 (2C, NCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>); 67,00 (2C, OCH<sub>2</sub>Ph); 80,97 (2C, CCH<sub>3</sub>); 127,89 (4C, arom); 127,93 (2C, arom.); 128,47 (4C, arom.); 136,85 (2C, arom. kvartérní); 156,48 (2C, NCO<sub>2</sub>); 170,54 (2C, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>).

MS-ESI: (+): 669,4 ([M+H]<sup>+</sup>, vypočteno 669,4).

### 3.3.13 1,7-bis-(*t*-butylkarboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (20)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.<sup>[54]</sup>. Ve 250ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo rozpuštěno 10,00 g látky **19** (14,95 mmol) ve 150 ml absolutního EtOH. Následně bylo do roztoku přidáno 2,0 g katalyzátoru Pd/C (20 hm. %; obsah paladia 10 %). Reakční směs byla intenzivně míchána pod vodíkovou atmosférou po dobu 4 dní. Poté byla reakční směs přefiltrována a roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl

rozpuštěn ve 150 ml Et<sub>2</sub>O, organická fáze byla extrahována 1× 20 ml 20% ledového vodného roztoku NaOH. Organická fáze byla vysušena pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrována a odpařena. Odparek byl dosušen *in vacuo*. Bylo připraveno 4,4 g látky **20** v podobě nažloutlého oleje.

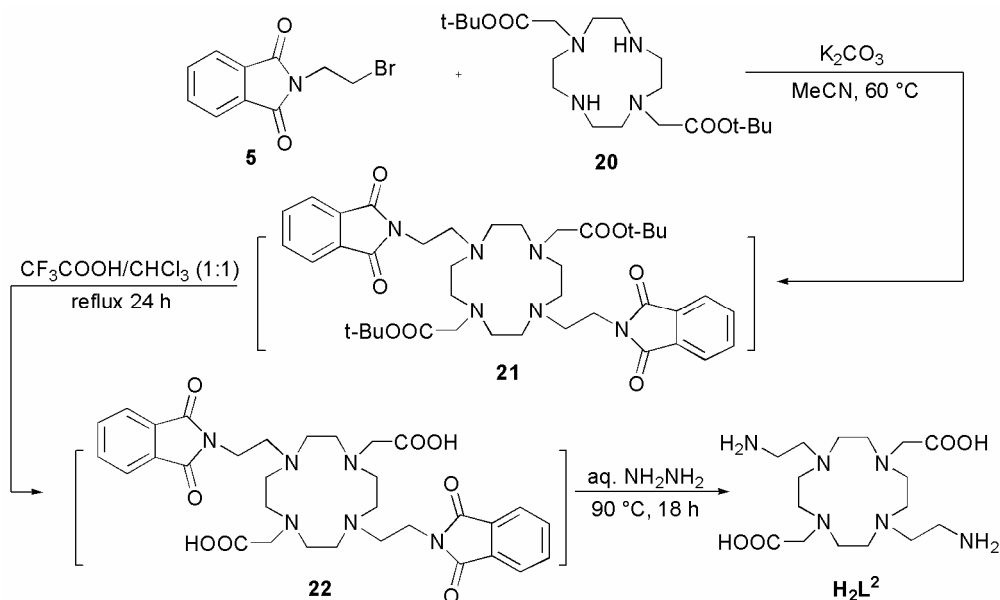
#### Charakterizace:

<sup>1</sup>H NMR (299,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,41 (18H, s, CH<sub>3</sub>); 2,55 (8H, t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4,8, NCH<sub>2</sub>); 2,74 (8H, br, NCH<sub>2</sub>); 3,26 (4H, s, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (75,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 28,33 (6C, CH<sub>3</sub>); 45,61 (4C, CH<sub>2</sub>); 52,09 (4C, CH<sub>2</sub>); 57,31 (2C, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>); 81,14 (2C, CCH<sub>3</sub>); 171,05 (2C, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>).

MS-ESI: (+): 401,1 ([M+H]<sup>+</sup>, vypočteno 401,3).

#### 3.3.14 1,7-bis(karboxymethyl)-4,10-bis(2-aminoethyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyklododekan (H<sub>2</sub>L<sup>2</sup>·2HCl·2,5H<sub>2</sub>O)



Ve 100ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem opatřené shora chlorkalciovou trubičkou bylo suspendováno 3,99 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (28,87 mmol, 4,9 ekv.) ve směsi 40 ml bezvodého MeCN a 2,36 g látky **20** (5,89 mmol). Poté bylo za míchání postupně přidáno 3,29 g látky **5** (12,96 mmol, 2,2 ekv.). Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni vyhřáté na 60 °C po dobu 24 hodin. Poté byla reakční směs analyzována pomocí TLC a hmotnostní spektrometrie. Přítomnost produktu **21** v reakční směsi byla metodou hmotnostní spektrometrie potvrzena. Poté byla reakční směs přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce. Nažloutlý olej byl rozpuštěn ve 20 ml CHCl<sub>3</sub> a protřepán 4× 10 ml H<sub>2</sub>O. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce. Bylo získáno 5,78 g oleje obsahujícího látku **21**.



Navážka 5,78 g oleje obsahujícího látku **21** byla rozpuštěna ve 100ml baňce ve směsi 22 ml  $\text{CF}_3\text{COOH}$  a 22 ml  $\text{CHCl}_3$ . Reakční směs byla po dobu 24 hodin zahřívána k varu na olejové lázni vyhřáté na 80 °C. Poté byl roztok odpařen dosucha na rotační vakuové odparce. Následně byl odparek rozpuštěn v malém množství destilované vody a roztok byl znovu odpařen na rotační vakuové odparce. Tento postup byl ještě 2× zopakován. Poté byl odparek rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a přečištěn sloupcovou chromatografií na silném kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50–100 mesh,  $\text{H}^+$ -cyklus, 2×12 cm). Nečistoty byly odstraněny promýváním  $\text{H}_2\text{O}$ . Meziprodukt **22** byl eluován 5% aq.  $\text{NH}_3$ . Poté byly eluáty zahuštěny, jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí TLC a frakce obsahující produkt **22** byly spojeny. Bylo získáno 2,72 g oleje obsahujícího látku **22**. Olej obsahující meziprodukt **22** připravený *in situ* byl použit pro další reakci bez dalšího čištění.

Olej obsahující látku **22** (2,72 g) byl rozpuštěn v 50ml baňce ve 20 ml 80% aq.  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni vyhřáté na 90 °C po dobu 18 hodin. Poté byl roztok odpařen dosucha na rotační vakuové odparce a odparek byl rozpuštěn v malém množství vody. Roztok byl poté přefiltrován a znovu odpařen na rotační vakuové odparce (tento postup byl 4× zopakován). Poté byl odparek rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a přečištěn sloupcovou chromatografií na silném aniontovém iontoměniči (Dowex 1,  $\text{OH}^-$ -cyklus, 2×10 cm). Nečistoty byly odstraněny promýváním  $\text{H}_2\text{O}$ . Produkt  $\text{H}_2\text{L}^2$  byl eluován 5% aq.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Poté byly eluáty zahuštěny, analyzovány pomocí TLC a frakce obsahující produkt  $\text{H}_2\text{L}^2$  byly spojeny. Bylo získáno 1,88 g oleje obsahujícího látku  $\text{H}_2\text{L}^2$ . Olej obsahující látku  $\text{H}_2\text{L}^2$  byl rozpuštěn v malém množství vody, do roztoku bylo přikapáno několik kapek 5%  $\text{HCl}$  a ligand  $\text{H}_2\text{L}^2$  byl poté za intenzivního míchání vysrážen pomalým přidáváním  $\text{EtOH}$ . Bylo izolováno 0,448 g (15,4 %) ligandu  $\text{H}_2\text{L}^2$  v podobě jemného bílého prášku. Matečný roztok byl odpařen, rozpuštěn opět v malém množství vody, do roztoku bylo přikapáno několik kapek 5%  $\text{HCl}$  a ligand  $\text{H}_2\text{L}^2$  byl poté za intenzivního míchání vysrážen pomalým přidáváním  $\text{EtOH}$ . Bylo izolováno 0,2 g (6,9 %) ligandu  $\text{H}_2\text{L}^2$  v podobě jemného bílého prášku. Celkem bylo izolováno 0,648 g (22,3 %; vztaženo k množství použité látky **9**) ligandu  $\text{H}_2\text{L}^2$  v podobě bílého jemného prášku  $\text{H}_2\text{L}^2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ .

#### Charakterizace:

##### Látka **21**

TLC: Silufol® - Kavalier, 20%  $\text{AcOH}$ , detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,40$ .

MS-ESI: (+): 747,5 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , vypočteno 747,4); 769,5 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; vypočteno 769,4).

##### Látka **22**

TLC: Silufol® - Kavalier, 20%  $\text{AcOH}$ , detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,37$ .

MS-ESI: (-): 633,2 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ , vypočteno 633,3).

### Látka **H<sub>2</sub>L<sup>2</sup>·2HCl·2,5H<sub>2</sub>O**

TLC: Silufol® - Kavalier, IPA V-7:3:3, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,61$ .

<sup>1</sup>H NMR (600,2 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  2,84 (4H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,3$ , CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 2,93 (4H, br, CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 3,04 (4H, br, CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 3,10 (4H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,3$ , CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 3,45 (4H, br, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO); 3,63 (4H, br, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO); 3,98 (4H, s, CH<sub>2</sub>CO).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150,9 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  36,82 (2C, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 48,54 (4C, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 51,04 (2C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 52,3 (4C, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO); 58,29 (2C, CH<sub>2</sub>CO); 170,63 (2C, CH<sub>2</sub>CO).

MS-ESI: (+): 375,0 ([M+H]<sup>+</sup>, vypočteno 375,3). (-): 372,9 ([M-H]<sup>-</sup>, vypočteno 373,3).

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>41</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6,5</sub>,  $M_r = 492,4$ ) C: 39,28 (39,02), H: 8,79 (8,39), N: 16,88 (17,07), Cl: 14,73 (14,40).

### 3.3.15 Příprava komplexů ligandů **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>**, **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>Me** a **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>2Me** s lanthanoidy

Hexahydrát nebo heptahydrát chloridu příslušného lanthanoidu (Eu<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup>, La<sup>3+</sup>) byl rozpuštěn ve vialce s 1,1 ekv. ligandu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>·3,5H<sub>2</sub>O** (resp. **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>Me**, **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>2Me**) v malém množství destilované vody. Následně bylo 1M roztokem LiOH upraveno pH roztoků na hodnotu přibližně 6. Roztoky byly míchány v olejové lázni vyhřáté na 60 °C přes noc. Poté bylo změřeno a následně upraveno pH roztoků na hodnotu přibližně 6,5. Opět byly vialky s roztoky míchány při teplotě 60 °C přes noc. Pomocí roztoku xylenolové oranže v urotropinovém pufru byla následně ověřena nepřítomnost volných iontů kovů v roztocích připravených komplexů.

## 3.4 METODY STUDIA PŘIPRAVENÝCH LIGANDŮ A KOMPLEXŮ

### 3.4.1 Potenciometrické titrace

Potenciometrické titrace byly provedeny v termostatu temperované titrační nádoby při teplotě  $25,0 \pm 0,1$  °C a při konstantní iontové síle titrovaného roztoku (0,1M  $\text{NMe}_4\text{Cl}$ ). Titrace byly provedeny za použití pH-metru PHM 240, automatické byrety ABU 900 s výtlačným objemem 2 ml a kombinované skleněné elektrody GK 2401B (vše Radiometer). Na odměřování zásobních roztoků byly použity pipety s mikrometrickým šroubem (o objemech přibližně 0,5 ml, 1,25 ml a 2,5 ml přesně, VŠCHT Pardubice). Počáteční objem titrovaného roztoku byl vždy přibližně 5 ml přesně, koncentrace ligandu v titrační nádobce byla vždy přibližně 0,004M přesně. Inertní atmosféra byla udržována stálým proudem argonu, který byl před vstupem do titrační nádoby nasycen vodní parou (průchodem přes 0,1M  $\text{NMe}_4\text{Cl}$ ). Aktuální koncentrace iontů  $\text{H}^+$  byla sledována kombinovanou skleněnou elektrodou s referentní argentchloridovou elektrodou, napětí bylo odečítáno s přesností 0,1 mV. Jako titrační roztok byl použit odměrný roztok  $\text{NMe}_4\text{OH}$  (0,20897M), jeho objem byl odečítán s přesností 0,001 ml.

Každé vlastní potenciometrické titraci předcházela kalibrační titrace. Byla použita technika externí kalibrace, při které byl titrovaným roztokem roztok připravený smícháním přesně 2,517 ml  $\text{HCl}$  (0,02979M) v  $\text{NMe}_4\text{Cl}$  (0,2M) s 2,512 ml (přesně) deionizované vody. Takto připravený roztok byl titrován odměrným roztokem  $\text{NMe}_4\text{OH}$  (0,20897M) v rozmezí  $-\log[\text{H}^+] = 2-12$ . Iontový součin vody  $pK_w = 13,81$ . Po kalibrační titraci následovala titrace samotného ligandu nebo systému ligand/kov (vždy v poměru 1:1).

Byly použity dvě techniky titrací, první technikou byla standardní titrace v titrační nádobce (pro kineticky rychlé systémy), druhou technikou byla tzv. „out-of-cell“ titrace pro systémy s pomalou kinetikou komplexace. První technika byla použita pro stanovení protonizačních konstant ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  a  $\text{H}_2\text{L}^2$  a při titraci systému  $\text{H}_3\text{L}^1:\text{M}$  (1:1) a  $\text{H}_2\text{L}^2:\text{M}$  (1:1) pro ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Druhá technika byla použita při titraci systémů  $\text{H}_3\text{L}^1:\text{M}$  a  $\text{H}_2\text{L}^2:\text{M}$  pro ionty  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  a  $\text{Y}^{3+}$ .

Data získaná z potenciometrických titrací byla vyhodnocena pomocí programového balíku OPIUM<sup>[55]</sup>.

### 3.4.2 $^1\text{H}$ NMR titrace

$^1\text{H}$  pH NMR titrace ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  byla provedena na spektrometru Bruker Avance (III) 600, NMR titrace ligandu  $\text{H}_2\text{L}^2$  byla provedena na spektrometru VNMR300.

Dva vzorky ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$  o koncentraci 50 mM byly připraveny rozpuštěním daného množství ligandu v deionizované vodě, pH roztoků jednoho vzorku bylo postupně upravováno roztokem 1mM nebo 0,5mM aq. HCl do kyselé oblasti, pH druhého vzorku bylo upravováno roztokem 1mM nebo 0,25mM aq. NMe<sub>4</sub>OH do bazické oblasti. Po každém přidavku kyseliny/báze bylo změřeno pH zkalibrovanou kombinovanou skleněnou elektrodou (Mettler Toledo) s pH metrem (3505 pH Meter, JENWAY). <sup>1</sup>H NMR spektra byla měřena při teplotě 25 °C s externím standardem *t*-BuOH v D<sub>2</sub>O ( $\delta_{\text{H}} = 1,25$  ppm) bez kontroly iontové síly. Stejný postup byl použit i při NMR titraci ligandu  $\mathbf{H_2L^2}$ . Data získaná z NMR titrací byla zpracována programovým balíkem OPIUM<sup>[55]</sup>.

### 3.4.3 Stanovení koncentrace komplexů v roztocích

Koncentrace komplexů lanthanoidů ve studovaných roztocích byly zjišťovány Evansovou metodou (BMS). Do roztoků komplexů v 5mm NMR kyvetě byl přidán *t*-BuOH (0,1–0,2 obj. %) a do kyvety byl vložen externí standard *t*-BuOH v D<sub>2</sub>O ( $\delta_{\text{H}} = 1,25$  ppm). U takto připraveného vzorku bylo změřeno standardní <sup>1</sup>H NMR spektrum a z naměřeného spektra byl odečten rozdíl chemických posunů *t*-BuOH v roztoku a v externím standardu. Takto odečtený indukovaný posun byl dosazen do rovnice (20), ze které byla vypočítána koncentrace lanthanoidu ve vzorku.

### 3.4.4 Studium izomerie komplexů v roztocích

Roztoky ytterbitých a europitých komplexů ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$ , jejichž příprava je popsána výše (Kapitola 3.3.15), byly odpařeny na rotační vakuové odparce a rozpuštěny v D<sub>2</sub>O, pH takto připravených roztoků bylo upraveno roztokem 1M, 0,5M nebo 0,25M aq. LiOH na hodnotu 8,5 (resp. 9); pH bylo změřeno zkalibrovanou kombinovanou skleněnou elektrodou Spintrode (Hamilton) s pH metrem 3505 pH Meter (JENWAY). Koncentrace komplexů v roztoku byla přibližně 0,1M. <sup>1</sup>H NMR spektra byla měřena na spektrometru VNMR300 (teploty 25–90 °C, krok 5, 10 nebo 20 °C) a na spektrometru Varian<sup>UNITY</sup> INOVA 400 (teplota 0 °C) s externím standardem *t*-BuOH v D<sub>2</sub>O ( $\delta_{\text{H}} = 1,25$  ppm).

<sup>1</sup>H NMR spektra ytterbitých a europitých komplexů ligandů  $\mathbf{H_3L^1Me}$  a  $\mathbf{H_3L^12Me}$  byla naměřena s roztoky připravenými k měření CEST experimentů. Příprava těchto roztoků je popsána v kapitole 3.4.5, koncentrace a hodnota pH měřených roztoků je uvedena pod jednotlivými spektry.

### 3.4.5 CEST experimenty

Metodika CEST experimentů byla nejprve testována na roztocích komplexů ligandu **DOTAM** (jednalo se o komplexy s ionty Eu<sup>3+</sup>, Dy<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup>), u nichž byl efekt CEST pozorován

a studován<sup>[56,33]</sup>. Naměřená data se podařilo zreprodukovat a takto zjištěné parametry měření byly použity pro další experimenty.

Roztoky europitých a ytterbitých komplexů ligandů  $\mathbf{H_3L^1}$ ,  $\mathbf{H_3L^1Me}$  a  $\mathbf{H_3L^12Me}$ , jejichž příprava je popsána výše (Kapitola 3.3.15), byly odpařeny na rotační vakuové odparce a rozpuštěny ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  1:10, pD takto připravených roztoků bylo upraveno na požadovanou hodnotu roztokem 1M, 0,5M nebo 0,25M aq. LiOH do bazické oblasti a roztokem 1mM nebo 0,5mM aq. HCl do kyselé oblasti. CEST spektra (respektive Z-spektra) byla měřena v rozmezí pH = 4,5–12 při teplotě 25–75 °C s krokem 10 °C. Koncentrace komplexů v roztocích jsou uvedeny u jednotlivých grafů.

Všechna Z-spektra byla naměřena na spektrometru VNMR300 v 5mm NMR kyvetě s externím standardem *t*-BuOH v  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\delta_{\text{H}} = 1,25$  ppm). K měření byla použita pulzní sekvence pro presaturační experimenty<sup>[57]</sup>, presaturační frekvence byly nastaveny pomocí „array“ s krokem 200–250 Hz,  $d_1 = 100$  ms. Další parametry měření (satdly, satpwr) jsou uvedeny u jednotlivých grafů.

MRI studie CEST efektu byly provedeny s vodnými roztoky europitých a ytterbitých komplexů ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$  (v tomto případě byly komplexy rozpuštěny v  $\text{H}_2\text{O}$  bez přídavku  $\text{D}_2\text{O}$ , postup přípravy těchto roztoků je jinak analogický k přípravě vzorků pro měření Z-spekter na spektrometru VNMR300). Pro europitý i ytterbitý komplex byly vytvořeny dva fantomy složené z pěti, resp. osmi 1ml skleněných vialek s roztoky komplexů o různé koncentraci, resp. různé hodnotě pH. Jako kontrolní vzorek byl použit roztok lanthanitého komplexu ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$  v 1ml skleněné vialce (připravený stejným způsobem jako europité a ytterbité komplexy). Měření byla provedena na 4,7T spektrometru Bruker (Bruker BioSpec, Germany). Byla použita buď pulzní sekvence rychlého spinového echa RARE (Rapid Acquisition with Refocused Echoes) nebo pulzní sekvence klasického spinového echa MSME (Multi Slice Multi Echo) s presaturačním pulzem. Parametry měření: TR = 5000 ms, TE = 8,9 ms, rozlišení  $0,35 \times 0,35 \times 2$  mm (poslední hodnota udává šířku vrstvy), turbo faktor = 4. Parametry presaturačního pulzu:  $B_1 = 20 \mu\text{T} = 850$  Hz, délka presat. pulzu 2 s. Presaturační frekvence byla měněna dle typu experimentu.

### 3.4.6 Teplotní $^{17}\text{O}$ NMR experimenty

Pro měření byly připraveny dva roztoky komplexu  $\text{Gd-L}^1$  v  $\text{H}_2\text{O}$  (viz. Kapitola 3.3.15) o koncentraci přibližně 120 mM. Hodnoty pH takto připravených roztoků byly upraveny na požadovanou hodnotu roztokem 0,5M aq. LiOH do bazické oblasti a roztokem 0,5mM aq. HCl do kyselé oblasti; pH bylo změřeno zkalibrovanou kombinovanou skleněnou elektrodou Spintrode (Hamilton) s pH metrem 3505 pH Meter (JENWAY). K roztokům komplexů v NMR kyvetě (objem 530  $\mu\text{l}$ ) bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  *t*-BuOH a 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2^{17}\text{O}$  (obohacení 12 obj. %), přesná

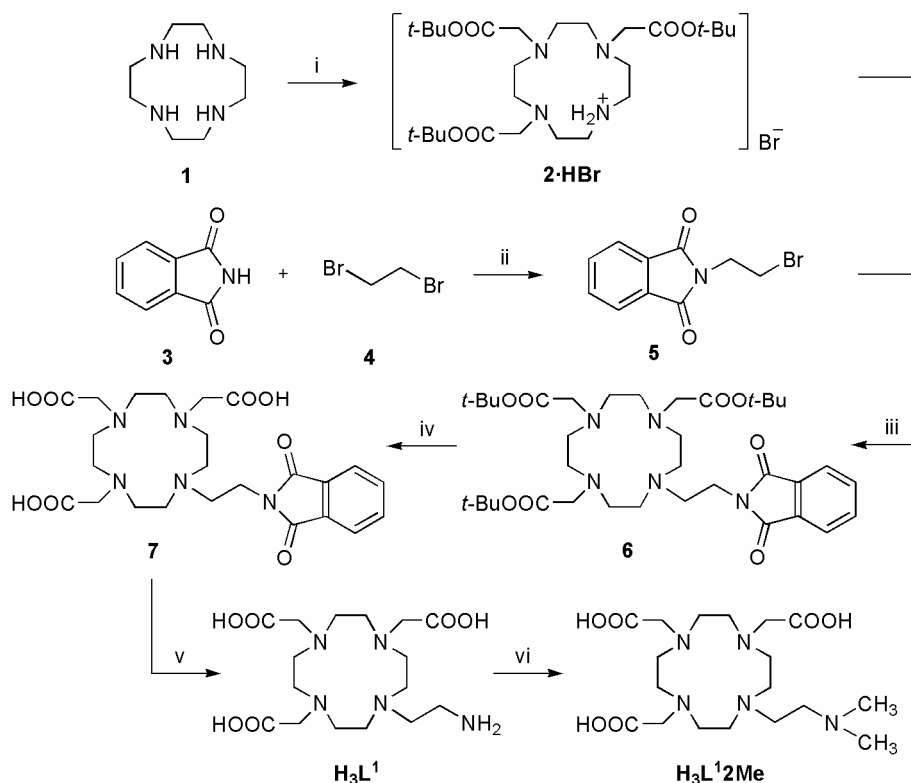
koncentrace roztoků byla stanovena Evansovou metodou (BMS). Referentní vzorek byl připraven okyselením  $\text{H}_2\text{O}$  kyselinou chloristou na pH odpovídající kyselému vzorku roztoku  $\text{Gd-L}^1$ . Do referentního roztoku bylo opět přidáno 10  $\mu\text{l}$   $t\text{-BuOH}$  a 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2^{17}\text{O}$  (obohacení 12 obj. %).

Byly měřeny  $T_1$  a  $T_2$  (longitudinální a transversální)  $^{17}\text{O}$  relaxační časy a chemický posun  $^{17}\text{O}$  signálu vody v roztoku gadolinitých komplexů a v roztoku reference. Byla měřena také  $^1\text{H}$  NMR spektra kvůli pozdější korekci posunů na příspěvek BMS. Měření byla provedena při teplotě 5–90 °C s krokem 5 nebo 10 °C.  $^{17}\text{O}$  a  $^1\text{H}$  NMR spektra byla měřena klasickou pulzní sekvencí s 90° pulzem.  $T_1$  relaxační časy byly měřeny pulzní sekvencí „inversion recovery“.  $T_2$  relaxační časy byly měřeny upravenou pulzní sekvencí „CPMG“ (Carr, Purcell, Meiboom, Gill). Při měření  $T_1$  i  $T_2$   $^{17}\text{O}$  relaxačních časů byl  $d2 = 20$  inkrementů s exponenciálním rozložením (nastaveno pomocí array). Při měření byl vypnut LOCK a SPIN. Délka 90° (resp. 180°) pulzu byla kalibrována pro každou teplotu.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 SYNTÉZA LIGANDŮ

#### 4.1.1 Syntéza ligandů $\text{H}_3\text{L}^1$ a $\text{H}_3\text{L}^12\text{Me}$



**Schéma 1:** Reakční podmínky přípravy ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  a  $\text{H}_3\text{L}^12\text{Me}$ : (i) *t*-BuOOCCH<sub>2</sub>Br, NaHCO<sub>3</sub>, MeCN (bezvodý), 0 °C–RT; (ii) DMF, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, TBAB, 40 °C; (iii) MeCN (bezvodý), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 60 °C; (iv) CF<sub>3</sub>COOH/CHCl<sub>3</sub> (1:1), reflux 24 h; (v) aq. NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 90 °C, 18 h; (vi) (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, HCOOH, reflux 24 h.

Syntéza ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  vycházela z komerčního cyklu **1** (Schéma 1). Prvním reakčním krokem při přípravě ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  byla syntéza *t*-Bu<sub>3</sub>DO3A·HBr (**2·HBr**). Látka *t*-Bu<sub>3</sub>DO3A·HBr (**2·HBr**) byla připravena alkylací cyklu (1,4,7,10-tetraazacyklododekanu) *t*-butylbromacetátem. Při reakci byl použit nadbytek alkylačního činidla (3,1 ekv.), aby bylo zabráněno vzniku disubstituovaného produktu (*t*-Bu<sub>2</sub>DO2A), který se od trisubstituovaného velmi obtížně odděluje. Tetrasubstituovaný produkt (*t*-Bu<sub>4</sub>DOTA), který vzniká při použití nadbytku alkylačního činidla, bylo možné oddělit od trisubstituovaného produktu extrakcí do toluenu (látka *t*-Bu<sub>4</sub>DOTA je v toluenu rozpustná, *t*-Bu<sub>3</sub>DO3A nikoliv). Látka **2** byla izolována v podobě **2·HBr**. Vzhledem ke vzniku vedlejšího produktu byl výtěžek reakce nižší (39 %), což ale odpovídá výtěžku reakce v dříve publikovaných postupech<sup>[50]</sup>.

Druhým reakčním krokem při přípravě ligandu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>** byla syntéza alkylačního činidla **5**. První pokus o přípravu látky **5** byl prováděn podle publikovaného postupu<sup>[51]</sup> za laboratorní teploty bez použití katalyzátoru fázového přenosu. Tento postup se ale ukázal jako nevhodný, ke vzniku produktu **5** nedocházelo (byla izolována výchozí látka **3**). Proto byly při další reakci reakční podmínky upraveny, reakce byla prováděna v přítomnosti TBAB jako katalyzátoru fázového přenosu, reakční směs byla míchána při teplotě 40 °C. Na rozdíl od publikovaných postupů byla extrakce látky **5** prováděna do ethylacetátu, nikoliv do chloroformu. Látku **5** se podařilo připravit s výtěžkem 88 %.

Meziprodukt **6** byl připraven *in situ* podle postupu uvedeného v lit.<sup>[52]</sup> (tento publikovaný postup nevycházel z *t*-Bu<sub>3</sub>DO3A, ale z Et<sub>3</sub>DO3A). K reakci byl použit bezvodý acetonitril a jemně rozetřený K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Při reakci docházelo ke vzniku vedlejšího produktu **5'** (Obrázek 10), který bylo možné oddělit (stejně jako nadbytek alkylačního činidla **5** v reakční směsi) od látky **6** pomocí HPLC. Pro účely charakterizace pomocí <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR byla reakční směs obsahující látku **6** nejprve analyzována pomocí HPLC na analytické koloně LunaPHC8 (150×4,6 mm, Phenomenex, průtoková rychlost 1 ml min<sup>-1</sup>), poté byla látka **6** přečištěna na semipreparativní koloně LunaPHC8 (250×21,1 mm, Phenomenex, průtoková rychlost 20 ml min<sup>-1</sup>). Detekce při 210 nm a 254 nm. Podmínky separace uvádí Tabulka 2.

**Tabulka 2:** Podmínky separace látky **6** pomocí HPLC. Složka: A = CH<sub>3</sub>CN, B = 0,1% roztok CF<sub>3</sub>COOH v H<sub>2</sub>O, C = H<sub>2</sub>O; složka C byla vždy dopočtena do 100 %.

kolona	složka A	složka B	<b>6</b> : <i>t<sub>R</sub></i> [min]
LunaPHC8 (analytická)	20–50 %, 0–10 min; 50 %, 10–20 min; 50–20 %, 20–20,5 min; 20 %, 20,5–30 min.	20 %, 0–30 min.	11,5
LunaPHC8 (preparativní)	20–50 %, 0–24 min; 50 %, 24–40 min; 50–20 %, 40–41 min; 20 %, 41–61 min.	20 %, 0–61 min.	17,0

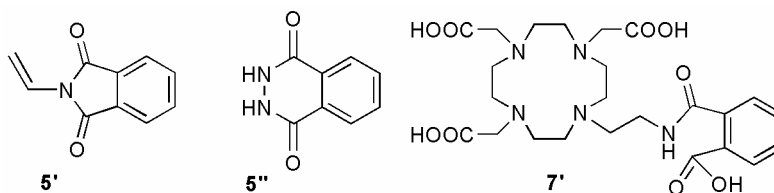
Ukázalo se, že k další reakci není nutné látku **6** čistit a je možné použít připravenou směs obsahující látku **6**, nezreagované alkylační činidlo **5** a vedlejší produkt **5'**. Podle HPLC byl obsah látky **6** v této směsi 70 %.

Látka **7** byla připravena *in situ* odbouráním chránících *t*-butylových skupin látky **6** ve směsi CF<sub>3</sub>COOH a CHCl<sub>3</sub> (1:1). Kyselé nečistoty byly odstraněny na silném kationtovém iontoměniči promýváním H<sub>2</sub>O, produkt byl eluován 5% aq. NH<sub>3</sub>. Při reakci docházelo (podle analýzy pomocí MS-ESI) ke vzniku vedlejšího produktu **7'** {MS-ESI: (–): 536,0 ([M–H]<sup>–</sup>, vypočteno 536,2)}, Obrázek 10. Podle <sup>1</sup>H NMR spekter lze také soudit, že docházelo ke vzniku vedlejšího produktu, kvůli překryvu signálů ale nelze naměřená spektra snadno interpretovat. Vzhledem k tomu, že při dalším reakčním kroku byla chránící ftaloylová skupina odbourána,



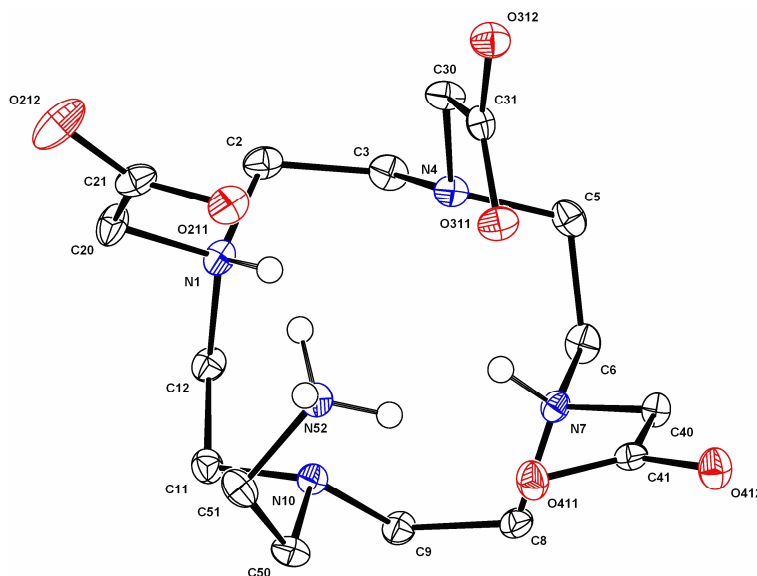
vedlejší produkt **7'** nebylo nutné od látky **7** separovat. Proto byla k další reakci použita směs látek **7** a **7'**.

Chránicí ftaloylová skupina látky **7** byla odbourána v prostředí 80% vodného roztoku hydrazinu (90 °C). Po několika hodinách byla reakční směs analyzována pomocí TLC a hmotnostní



**Obrázek 10:** Struktury vedlejších produktů vznikajících při přípravě ligandu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>**.

spektrometrie, přítomnost produktu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>** byla potvrzena. Po 24 hodinách byla reakční směs odpařena a rozpuštěna v malém množství vody. Při reakci docházelo ke vzniku ftalhydrazidu **5''** (Obrázek 10), který byl částečně odfiltrován. Neodfiltrovaný ftalhydrazid **5''** byl poté oddělen od látky **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>** chromatografií na silném aniontovém iontoměniči v OH<sup>-</sup>-cyklu. Ligand **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>** byl izolován v podobě **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>·3,5H<sub>2</sub>O** ve výtěžku 39 % (vzhledem k použitému množství **2·HBr**) a byl charakterizován dostupnými metodami. Monokrystal pro rentgenostrukturní analýzu byl získán pomalým odpařováním vodného roztoku ligandu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>** (Obrázek 11; krystalografická data viz. Příloha 1).

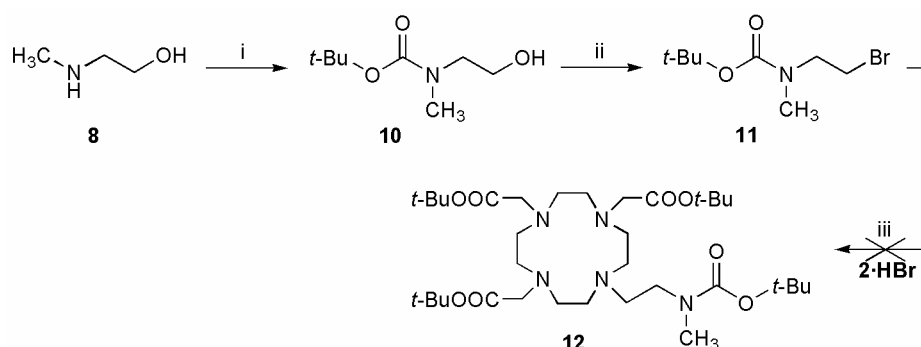


**Obrázek 11:** Molekulární struktura **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>** ze struktury **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>·5H<sub>2</sub>O**. Teplotní elipsoidy jsou vykresleny s 50% pravděpodobností. Atomy vodíku vázané na atomech uhlíku byly pro přehlednost vynechány.

Ligand **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>2Me** byl připraven reduktivní alkylací primárního aminu ligandu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>** paraformaldehydem v prostředí kyseliny mravenčí jako redukčního činidla (Schéma 1). Reakce byla prováděna pod zpětným chladičem, docházelo tedy k úniku plynného CH<sub>2</sub>O z reakční směsi, proto musel být v průběhu reakce paraformaldehyd do reakční směsi postupně přidáván. Reakční směs byla průběžně analyzována pomocí <sup>1</sup>H NMR, díky signálům methylových skupin bylo možné

sledovat konverzi výchozí látky  $\text{H}_3\text{L}^1$  (přes meziprodukt  $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$ ) na produkt  $\text{H}_3\text{L}^2\text{Me}$  (jednou methylovaný meziprodukt  $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$  poskytoval signál protonů methylové skupiny s nižším chemickým posunem než produkt  $\text{H}_3\text{L}^2\text{Me}$ ). Nadbytek kyseliny mravenčí byl v závěrečné fázi přípravy ligandu  $\text{H}_3\text{L}^2\text{Me}$  odstraněn několikerým odpařením látky  $\text{H}_3\text{L}^2\text{Me}$  z vody. Ligand  $\text{H}_3\text{L}^2\text{Me}$  byl takto připraven v kvantitativním výtěžku.

#### 4.1.2 Syntéza ligandu $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$



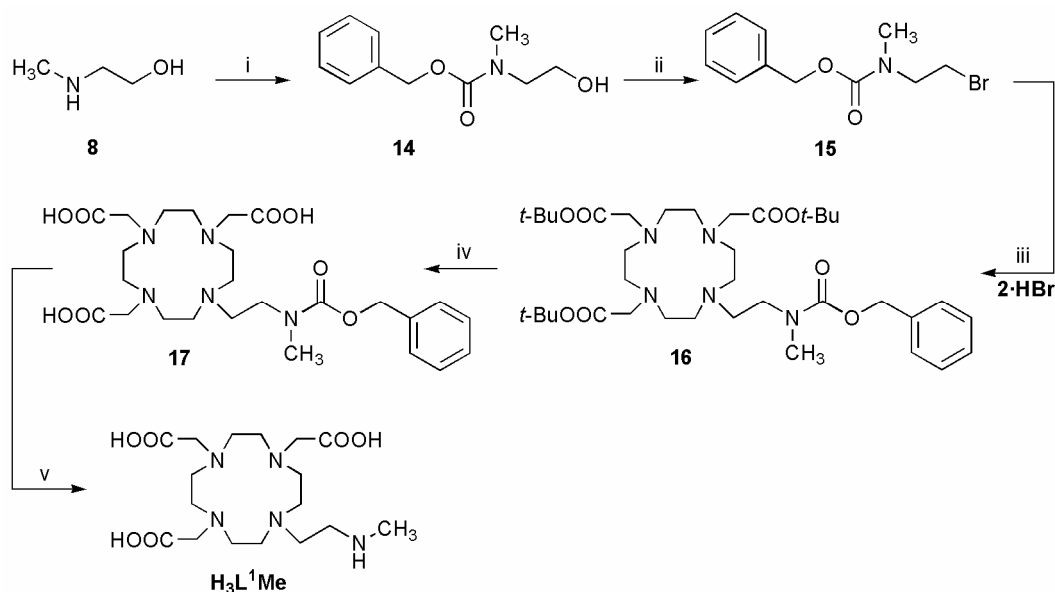
**Schéma 2:** Reakční podmínky při pokusu o přípravu látky **12**: (i)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , RT, 10 min; (ii)  $\text{CBr}_4$ ,  $\text{PPh}_3$ , THF (bezvodý), RT, 1 h; (iii)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ , MeCN (bezvodý), RT–60 °C.

První pokusy o přípravu ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$  vycházely z reakce  $t\text{-Bu}_3\text{DO3A}\cdot\text{HBr}$  (**2·HBr**) s Boc chráněným (*N*-methylamino)bromethanem **11** (Schéma 2). Látka **10** byla připravena podle postupu uvedeného v lit.<sup>[53]</sup> zavedením *t*-butyloxykarbonylové (Boc) chránicí skupiny acylací sekundárního aminu v molekule *N*-methylaminoethanolu **8** pomocí Boc-anhydridu **9**. Bromaci látky **10** tetrabrommethanem bylo nutné provádět v bezvodém THF bez přístupu světla, aby bylo zabráněno rozkladu výchozí látky **10** a vznikajícího produktu **11**. Vznikající trifenyfosfinoxid byl odfiltrován, nadbytek trifenyfosfinu (stejně jako další nečistoty) byl od látky **11** oddělen sloupcovou chromatografií na silikagelu. Připravenou látku **11** bylo nutné uchovávat v lednici, i přesto ale docházelo k jejímu postupnému rozkladu.

Pokus o přípravu látky **12** byl proveden v prostředí bezvodého acetonitrilu za použití jemně rozetřeného  $\text{K}_2\text{CO}_3$  jako báze. Pomocí  $^1\text{H}$  NMR spekter bylo při přípravě látky **11** zjištěno, že alkylační činidlo **11** se postupně rozkládá, proto byla reakční směs nejprve míchána při laboratorní teplotě, aby bylo zabráněno rychlému rozkladu látky **11**. Analýzou reakční směsi pomocí hmotnostní spektrometrie bylo po 24 hodinách od spuštění reakce zjištěno, že došlo jen k malé konverzi látky **2** na produkt **12**, pravděpodobně tedy došlo k rozkladu látky **11**. Poté byl do reakční směsi přidán *N,N*-diisopropylethylamin jako báze pro případ, že by nízká konverze nebyla důsledkem rozkladu látky **11**, ale důsledkem nízké aktivity heterogenní báze. Ze stejného důvodu byla poté reakční směs zahřívána na teplotu 60 °C. Analýza reakční směsi pomocí hmotnostní spektrometrie i po změně reakčních podmínek poskytovala stejný výsledek jako

v předchozích případech. Poté byla provedena analýza reakční směsi pomocí  $^1\text{H}$  NMR (vzorek reakční směsi byl přefiltrován a odpařen na rotační vakuové odparce), podle  $^1\text{H}$  NMR spekter bylo zjištěno, že reakční směs obsahovala nezreagovanou látku **2** a produkty rozkladu látky **11**. Konverze výchozí látky **2** na produkt **12** byla příliš nízká na to, aby byl produkt **12** separován, a reakční směs nebyla dále zpracovávána.

Z důvodů rychlého rozkladu látky **11** a následného neúspěchu při alkylaci ***t*-Bu<sub>3</sub>DO3A** tímto alkylačním činidlem byl zvolen alternativní postup syntézy. Tím bylo nahrazení labilní *t*-butyloxykarbonylové (Boc) chránící skupiny v molekule látky **11** (resp. **10**) benzyloxykarbonylovou (Z) chránící skupinou. Postup syntézy uvádí Schéma 3.



**Schéma 3:** Reakční podmínky přípravy ligandu **H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>Me**: (i) Z-Cl, dioxan/H<sub>2</sub>O (1:1), RT, 2 h; (ii) CBr<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, THF (bezvodý), RT, 1 h; (iii) **2·HBr**, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeCN (bezvodý), RT–60 °C; (iv) CF<sub>3</sub>COOH/CHCl<sub>3</sub> (1:1), reflux 24 h; (v) H<sub>2</sub>, Pd/C, 20% aq. CH<sub>3</sub>COOH, RT.

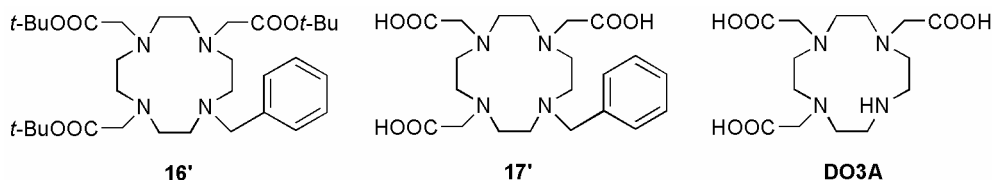
Látka **14** byla připravena zavedením benzyloxykarbonylové chránící skupiny acylací sekundárního aminu v molekule *N*-methylaminoethanolu **8** pomocí **Z-Cl 13**. Reakce byla provedena v nadbytku (4 ekv.) *N*-methylaminoethanolu **8**, aby došlo k 100% konverzi **Z-Cl** (*N*-methylaminoethanol sloužil zároveň jako báze). Nadbytek látky **8** byl oddělen extrakcí z toluenu do vody a do 3% vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové.

Bromace látky **14** tetrabrommethanem byla provedena za laboratorní teploty v bezvodém THF. Vznikající trifenyfosfinoxid byl odfiltrován, látka **15** byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu. Nadbytek trifenyfosfinu byl oddělen promytím sloupce CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, produkt **15** byl eluován směsí aceton/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:9). Připravená látka **15** na rozdíl od látky **11** nepodléhala rychlému rozkladu a byla použita k další reakci.

Meziprodukt **16** byl připraven *in situ* v prostředí bezvodého acetonitrilu za použití jemně rozetřeného  $K_2CO_3$  jako báze. Při reakci docházelo ke vzniku vedlejšího produktu **16'** {TLC: Silufol<sup>®</sup> - Kavalier, IPAV-5:1:1, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,78$ ; MS-ESI: (+): 606,1 ( $[M+H]^+$ , vypočteno 605,4)}. Snahy o separaci látek **16** a **16'** pomocí chromatografie na silikagelu vedly k příliš velkým ztrátám, proto nebyla látka **16** v tomto reakčním kroku čištěna a pro další reakci byla použita připravená směs obsahující látku **16**, nezreagované alkylační činidlo **15** a vedlejší produkt **16'**.

Meziprodukt **17** byl připraven *in situ* odbouráním chránících *t*-butylových skupin látky **16** eliminací ve směsi  $CF_3COOH$  a  $CHCl_3$  (1:1). Kyselé nečistoty byly odstraněny na silném kationtovém iontoměniči promýváním  $H_2O$ , produkt byl eluován 5% aq.  $NH_3$ . Eliminací vedlejšího produktu **16'** docházelo ke vzniku látky **17'** {TLC: Silufol<sup>®</sup> - Kavalier, IPAV-7:3:3, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,77$ ; MS-ESI: (-): 406,1 ( $[M-H]^-$ , vypočteno 406,2)}; Obrázek 12. Vedlejší produkt **17'** nebyl od látky **17** separován, k dalšímu reakčnímu kroku byla použita směs látek **17** a **17'**.

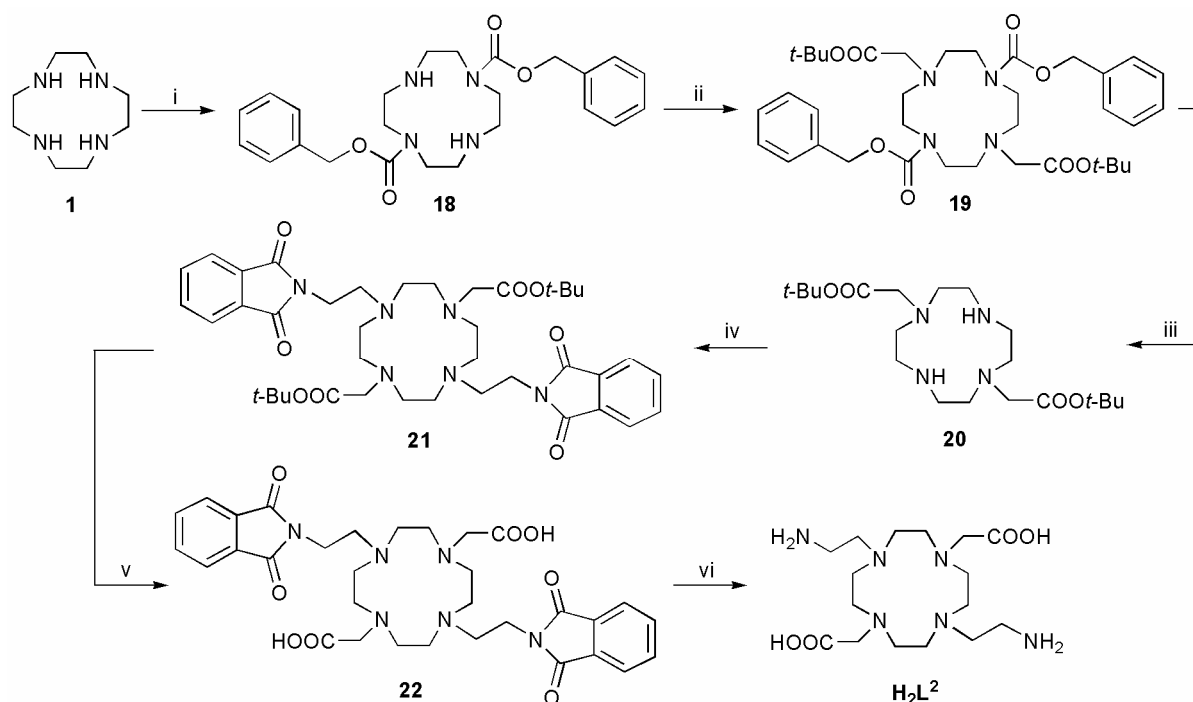
Chránící benzyloxykarbonylová skupina látky **17** byla odbourána katalytickou hydrogenací při laboratorní teplotě v prostředí 20% aq.  $CH_3COOH$ . Při těchto reakčních podmínkách byla odbourána i benzylová chránící skupina vedlejšího produktu **17'** za vzniku **DO3A** (TLC: Silufol<sup>®</sup> - Kavalier, IPAV-7:3:3, detekce ninhydrinem,  $R_f = 0,45$ ); Obrázek 12.



**Obrázek 12:** Struktury vedlejších produktů vznikajících při přípravě ligandu  $H_3L^1Me$ .

Pro oddělení vedlejšího produktu **DO3A** od ligandu  $H_3L^1Me$  byla směs látek nejprve převedena na amonné soli na silném kationtovém iontoměniči. Poté byla **DO3A** od ligandu  $H_3L^1Me$  oddělena na slabém kationtovém iontoměniči promýváním vodou (jednotlivé frakce byly kontrolovány pomocí TLC), produkt  $H_3L^1Me$  byl eluován 3% vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové. Vzhledem ke vzniku vedlejšího produktu **16'** a ztrátám při čištění byl produkt  $H_3L^1Me$  izolován v poměrně malém množství. Reakční podmínky prozatím nebyly optimalizovány.

### 4.1.3 Syntéza ligandu $H_2L^2$



**Schéma 4:** Reakční podmínky přípravy ligandu  $H_2L^2$ : (i)  $Z-Cl$ ,  $NaOH$ , dioxan,  $pH = 2-3$ , RT; (ii)  $t-BuOOCCH_2Br$ ,  $iPr_2NEt$ , MeCN (bezvodý),  $40-60\text{ }^\circ C$ ; (iii)  $H_2$ ,  $Pd/C$ , EtOH (bezvodý), RT; (iv) MeCN,  $K_2CO_3$ ,  $60\text{ }^\circ C$ ; (v)  $CF_3COOH/CHCl_3$  (1:1), reflux 24 h; (vi) aq.  $NH_2NH_2$ ,  $90\text{ }^\circ C$ , 18 h.

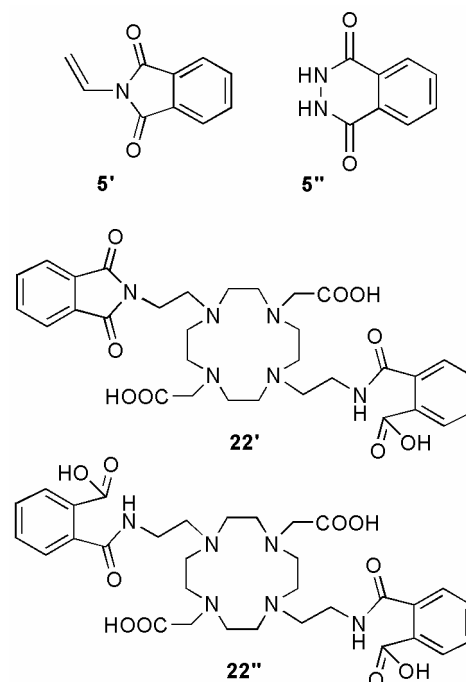
Celkový postup syntézy ligandu  $H_2L^2$  popisuje Schéma 4. První část přípravy ligandu  $H_2L^2$  spočívala v tříkrokové syntéze látky  **$t-Bu_2DO_2A$  (20)** z výchozího cyklenu **1** podle lit.<sup>[54]</sup>. Látka **18** byla připravena zavedením benzyloxykarbonylových chránících skupin acylací cyklenu benzylochloroformiátem ( **$Z-Cl$** ). Při reakci vznikal vedlejší tetrasubstituovaný produkt, který bylo možné oddělit od chtěného produktu **18** extrakcí do diethyletheru. Regioselektivita reakce do  $N^1, N^7$ -polohy byla zajištěna udržováním  $pH$  reakční směsi na hodnotě 2–3, kdy jsou naprotonizovány právě dva atomy dusíku makrocyklu. Látka **19** byla připravena alkylací látky **18** *t*-butylbromacetátem za použití *N,N*-diisopropylethylaminu jako báze. Katalytickou hydrogenací v prostředí absolutního lihu byly poté selektivně odbourány benzyloxykarbonylové chránící skupiny za vzniku látky **20**. Při této reakci bylo nutné použít větší množství katalyzátoru  $Pd/C$  (cca. 20 hm. %), aby bylo dosaženo 100% konverze.

Meziprodukt **21** byl připraven *in situ* (postup analogický k postupu přípravy meziproduktu **6**) v prostředí bezvodého acetonitrilu za použití jemně rozetřeného  $K_2CO_3$  jako báze. Při reakci opět docházelo ke vzniku vedlejšího produktu **5'**. Opět se ukázalo, že k další reakci není nutné látku **21** čistit a je možné použít připravenou směs obsahující látku **21**, nezreagované alkylační činidlo **5** a vedlejší produkt **5'**.

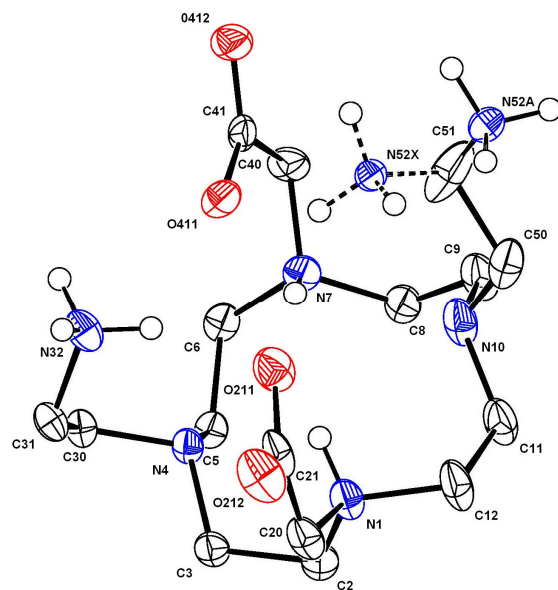
Meziprodukt **22** byl připraven *in situ* (postup analogický k postupu přípravy látky **7**) odbouráním chránících *t*-butylových skupin látky **21** ve směsi  $\text{CF}_3\text{COOH}$  a  $\text{CHCl}_3$  (1:1). Kyselé nečistoty byly odstraněny na silném kationtovém iontoměniči promýváním  $\text{H}_2\text{O}$ , produkt byl eluován 5% aq.  $\text{NH}_3$ . Podle analýzy reakční směsi pomocí MS-ESI docházelo při reakci ke vzniku vedlejších produktů **22'** a **22''** {MS-ESI: (+): 653,3 ( $[\text{M}' + \text{H}]^+$ , vypočteno 653,3); 671,3 ( $[\text{M}'' + \text{H}]^+$ ; vypočteno 671,3). (-): 651,2 ( $[\text{M}' - \text{H}]^-$ , vypočteno 651,3), 669,1 ( $[\text{M}'' - \text{H}]^-$ , vypočteno 669,1) kde  $\text{M}' = \mathbf{22'}$ ;  $\text{M}'' = \mathbf{22''}$ }. Podle  $^1\text{H}$  NMR spekter lze (stejně jako při analýze  $^1\text{H}$  NMR spekter v případě přípravy látky **7**) soudit, že docházelo ke vzniku vedlejších produktů, kvůli překryvu signálů ale nelze naměřená spektra snadno interpretovat. Vzhledem k tomu, že při dalším reakčním kroku byla chránící ftaloylová skupina odbourána, vedlejší produkty **22'** a **22''** nebylo nutné od látky **22** separovat. Proto byla k další reakci použita směs látek **22**, **22'** a **22''**.

Chránící ftaloylová skupina látky **22** byla odbourána v prostředí 80% vodného roztoku hydrazinu (90 °C). Reakční směs byla po 24 hodinách analyzována pomocí TLC a pomocí hmotnostní spektrometrie, přítomnost produktu  $\text{H}_2\text{L}^2$  byla potvrzena. Při reakci docházelo ke vzniku ftalhydrazidu **5''**, který byl částečně odfiltrován. Neodfiltrovaný ftalhydrazid **5''** byl poté oddělen od látky  $\text{H}_2\text{L}^2$  chromatografií na silném aniontovém iontoměniči v  $\text{OH}^-$ -cyklu.

Ligand  $\text{H}_2\text{L}^2$  byl izolován v podobě  $\text{H}_2\text{L}^2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$  ve výtěžku 22 % (vzhledem k množství použité látky **20**) a charakterizován dostupnými metodami. Monokrystal pro rentgenostrukturní analýzu byl (stejně jako v případě ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$ ) získán pomalým odpařováním vodného roztoku ligandu  $\text{H}_2\text{L}^2$  ve vialce (Obrázek 14; krystalografická data viz. Příloha 1).



**Obrázek 13:** Struktury vedlejších produktů vznikajících při přípravě ligandu  $\text{H}_2\text{L}^2$ .



**Obrázek 14:** Molekulární struktura  $(\text{H}_4\text{L}^2)^{2+}$  ze struktury  $\text{H}_2\text{L}^2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ . Teplotní elipsoidy jsou vykresleny s 50% pravděpodobností. Atomy vodíku vázané na atomech uhlíku byly pro přehlednost vynechány.

## 4.2 STUDIUM PŘIPRAVENÝCH LIGANDŮ A KOMPLEXŮ

### 4.2.1 Potenciometrické titrace

Disociaci vícesytné kyseliny  $H_hL$  popisuje rovnice (21), každému disociačnímu stupni odpovídá rovnovážná disociační konstanta  $K_a(H_hL)$  (22) (v následujících rovnicích jsou pro přehlednost vynechány náboje jednotlivých částic)



$$K_a(H_hL) = \frac{[H] \times [H_{h-1}L]}{[H_hL]} \quad (22)$$

Jedná se o konsektivní disociační konstanty, které popisují postupnou disociaci molekuly. Hodnota disociační konstanty se nejčastěji uvádí jako  $pK_a$  ( $pK_a = -\log K_a$ ).

Celková protonizační konstanta  $\beta_h$  vícesytné kyseliny pak popisuje celkovou protonizaci molekuly (23), (24)



$$\beta_h = \frac{[H_hL]}{[H]^h \times [L]} \quad (24)$$

Vztah mezi celkovou protonizační konstantou  $\beta_h$  a konsektivní disociační konstantou  $K_a$  je obecně (25)

$$pK_a(H_hL) = \log \beta_h - \log \beta_{h-1} \quad (25)$$

Ze vztahu (25) je patrné, že hodnotu disociační konstanty  $pK_a$  je možné určit odečtením dvou hodnot  $\log \beta_h$  pro částice, které se liší o jeden proton.

Celková konstanta stability komplexu  $\beta_{lm}$  je definována pro děj popsany rovnicí (26) vztahem (27)



$$\beta_{lm} = \frac{[ML_l]}{[M] \times [L]^l} \quad (27)$$

Pro nejobecnější systém popsany rovnicí (28)



je celková konstanta stability protonizovaného komplexu  $[H_hL_lM_m]$  definována vztahem (29)

$$\beta_{hlm} = \frac{[H_hL_lM_m]}{[H]^h \times [L]^l \times [M]^m} \quad (29)$$

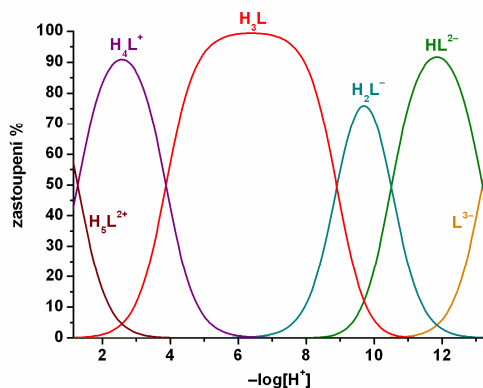


Z dat získaných při potenciometrické titraci ligandu  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$  bylo pomocí programu OPIUM určeno pět protonizačních konstant. Nejvyšší určená konstanta  $\log\beta_1 = \text{p}K_a(\text{HL}) = 13,19$  odpovídá protonizaci zcela deprotonizovaného ligandu  $(\mathbf{L}^1)^{3-}$ , nejnižší dílčí protonizační konstanta  $\log\beta_5 - \log\beta_4 = \text{p}K_a(\text{H}_5\mathbf{L}) = 1,27$  odpovídá rovnováze mezi částicemi  $(\text{H}_5\mathbf{L}^1)^{2+}$  a  $(\text{H}_4\mathbf{L}^1)^+$ .

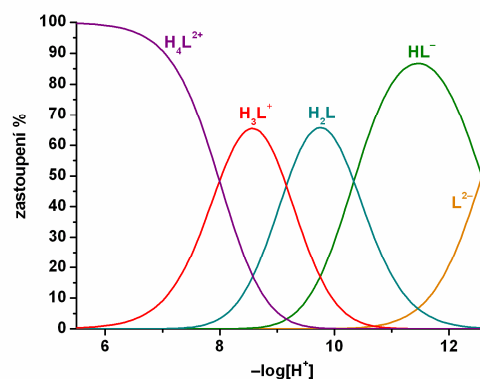
Z dat získaných při potenciometrické titraci ligandu  $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$  byly pomocí programu OPIUM určeny čtyři protonizační konstanty. Nejvyšší určená konstanta  $\log\beta_1 = \text{p}K_a(\text{HL}) = 12,57$  odpovídá protonizaci zcela deprotonizovaného ligandu  $(\mathbf{L}^2)^{3-}$ , nejnižší určená dílčí protonizační konstanta  $\log\beta_4 - \log\beta_3 = \text{p}K_a(\text{H}_4\mathbf{L}) = 7,87$  odpovídá rovnováze mezi částicemi  $(\text{H}_4\mathbf{L}^2)^{2+}$  a  $(\text{H}_3\mathbf{L}^2)^+$ . Další protonizační konstanty se nachází v extrémně kyselé oblasti a nemohly být pomocí potenciometrické titrace určeny (měření bylo provedeno v rozsahu pH = 2–12). Pátá protonizační konstanta byla určena pomocí  $^1\text{H}$  pH NMR titrace ligandu  $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$  (Kapitola 4.2.2).

**Tabulka 3:** Hodnoty celkových protonizačních konstant a odpovídajících  $\text{p}K_a$  ligandů  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$  a  $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$  vypočítaných programem OPIUM z dat získaných při potenciometrických titracích a srovnání s konsekutivními protonizačními konstantami ligandu **DOTA**. Pro přehlednost nejsou uvedeny náboje jednotlivých částic.

		$\mathbf{H}_5\mathbf{L}$	$\mathbf{H}_4\mathbf{L}$	$\mathbf{H}_3\mathbf{L}$	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}$	$\mathbf{HL}$
$\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$ <sup>a</sup>	$\log\beta$	37,75(2)	36,47(2)	32,60(2)	23,70(2)	13,19(2)
	$\text{p}K_a$	1,27	3,87	8,9	10,5	13,19
$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ <sup>a</sup>	$\log\beta$	–	40,06(1)	32,07(1)	22,91(1)	12,57(1)
	$\text{p}K_a$	–	7,87	9,16	10,34	12,57
<b>DOTA</b> <sup>a,b</sup>	$\text{p}K_a$	2,36	4,13	4,6	9,72	11,9



I.



II.

**Obrázek 15:** Distribuční diagramy **I.** ligandu  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$  **II.** ligandu  $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$  v závislosti na pH daného systému ( $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ).

Dále byly studovány konstanty stability komplexů ligandů  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$  a  $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$  s ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  a  $\text{Gd}^{3+}$  (vždy v poměru kov:ligand 1:1). Obrázek 16 a Obrázek 17 uvádí distribuční diagramy pro dané systémy kov: $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$  nebo kov: $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$ . Chemický model systémů  $\text{M}:\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$ , který poskytl nejlepší shodu s experimentálními daty, zahrnoval vznik komplexů  $\text{ML}^1$  a  $\text{HML}^1$ .

Je patrné, že konstanty stability komplexů ligandu  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$  s ionty  $\text{Gd}^{3+}$  jsou vyšší než v případě analogických komplexů s většími ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{La}^{3+}$ , což odpovídá obecnému trendu u dříve studovaných ligandů typu DOTA (Tabulka 4, Tabulka 5). Konsekutivní disociační konstanta  $\text{p}K_a(\text{HLM}) = 5,83$  odpovídá deprotonizaci protonizovaného primárního aminu komplexní částice  $(\text{Gd-HL}^1)^+$ . Tato informace je důležitá pro přípravu komplexů tohoto ligandu s lanthanoidy pro další experimenty.

**Tabulka 4:** Hodnoty konstant stability komplexů ligandů  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$  a  $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$  s vybranými ionty kovů určené programem OPIUM z dat získaných při potenciometrických titracích a srovnání s konstantami stability komplexů ligandu **DOTA**. Pro přehlednost nejsou uvedeny náboje jednotlivých částic.

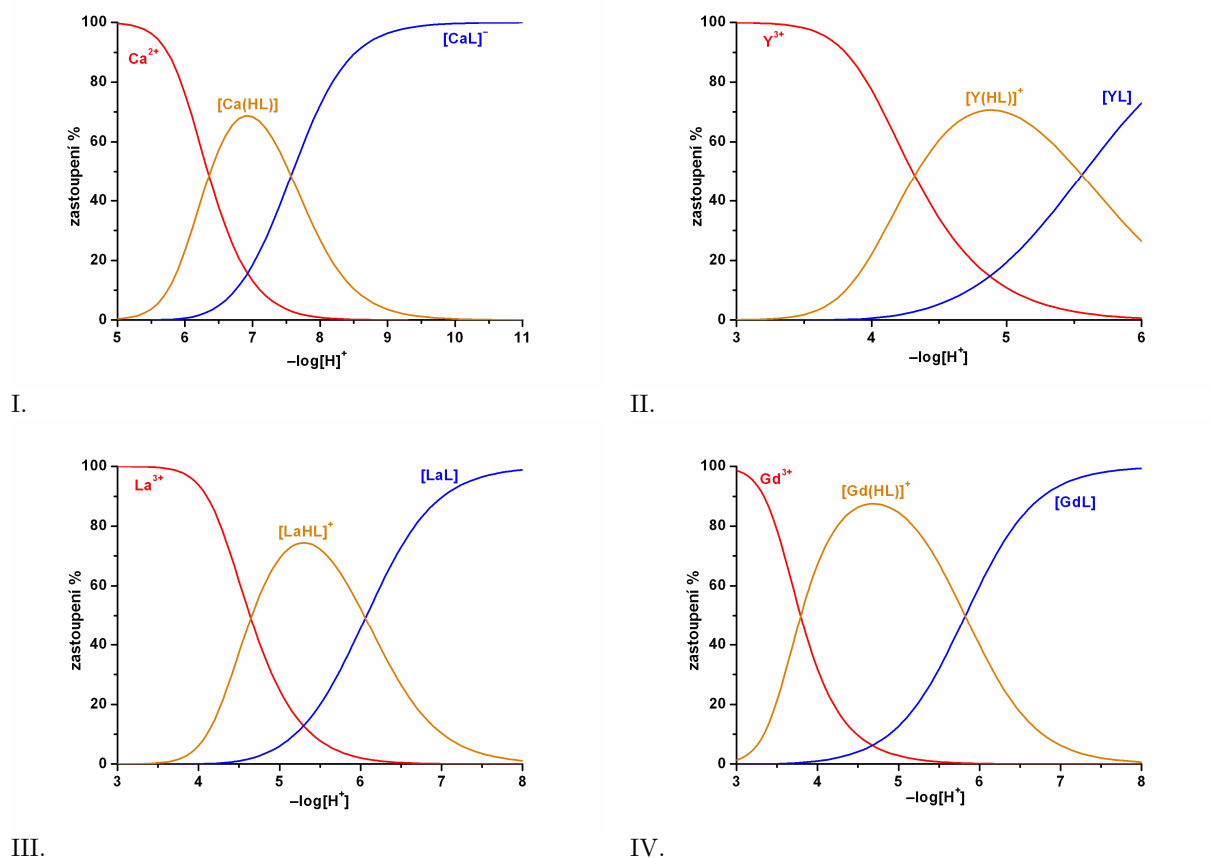
		$\log\beta_{hlm}$				
	Rovnováha	$hlm$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Y}^{3+}$	$\text{La}^{3+}$	$\text{Gd}^{3+}$
$\mathbf{H}_3\mathbf{L}^{1a}$	$\text{M} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{ML}]$	011	15,03(1)	21,25(4)	20,02(3)	22,23(4)
	$\text{H} + \text{M} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{M}(\text{HL})]$	111	22,60(1)	26,80(2)	26,08(2)	28,06(1)
$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^{2a}$	$\text{H}_2\text{O} + \text{M} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{M}(\text{OH})\text{L}] + \text{H}$	-111	-1,25(5)	9,54(5)	–	10,27(2)
	$\text{M} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{ML}]$	011	11,78(1)	16,38(5)	18,71(4)	17,45(2)
	$\text{H} + \text{M} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{M}(\text{HL})]$	111	19,10(2)	–	–	–
<b>DOTA</b> <sup>b</sup>	$\text{M} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{ML}]$	011	17,02	24,3	22,9	24,7
	$\text{H} + \text{M} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{M}(\text{HL})]$	111	20,9	–	–	–

<sup>a</sup>  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$ , 25 °C. <sup>b</sup>  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$ , 25 °C nebo  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ , 25 °C lit.<sup>[59,60]</sup>.

**Tabulka 5:** Hodnoty konstant stability  $\log K_{\text{ML}}$  nebo disociační konstanty komplexů  $\text{p}K_a(\text{HLM})$  ligandů  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$  a  $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^2$  s vybranými ionty kovů určené programem OPIUM z dat získaných při potenciometrických titracích a srovnání s konstantami stability a disociačními konstantami komplexů ligandu **DOTA**. Pro přehlednost nejsou uvedeny náboje jednotlivých částic.

		$\log K_{\text{ML}}$ nebo $\text{p}K_a$			
	Rovnováha	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Y}^{3+}$	$\text{La}^{3+}$	$\text{Gd}^{3+}$
$\mathbf{H}_3\mathbf{L}^{1a}$	$\text{M} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{ML}]$	15,03	21,33	20,02	22,23
	$[\text{M}(\text{HL})] \rightleftharpoons [\text{ML}] + \text{H}$	7,57	5,46	6,06	5,83
$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^{2a}$	$[\text{M}(\text{H}_2\text{O})\text{L}] \rightleftharpoons [\text{ML}(\text{OH})] + \text{H}$	13,03	6,84	–	7,18
	$\text{M} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{ML}]$	11,78	16,38	18,71	17,45
	$[\text{M}(\text{HL})] \rightleftharpoons [\text{ML}] + \text{H}$	7,32	–	–	–
<b>DOTA</b> <sup>b</sup>	$\text{M} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{ML}]$	17,02	24,3	22,9	24,7
	$[\text{M}(\text{HL})] \rightleftharpoons [\text{ML}] + \text{H}$	3,88	–	–	–

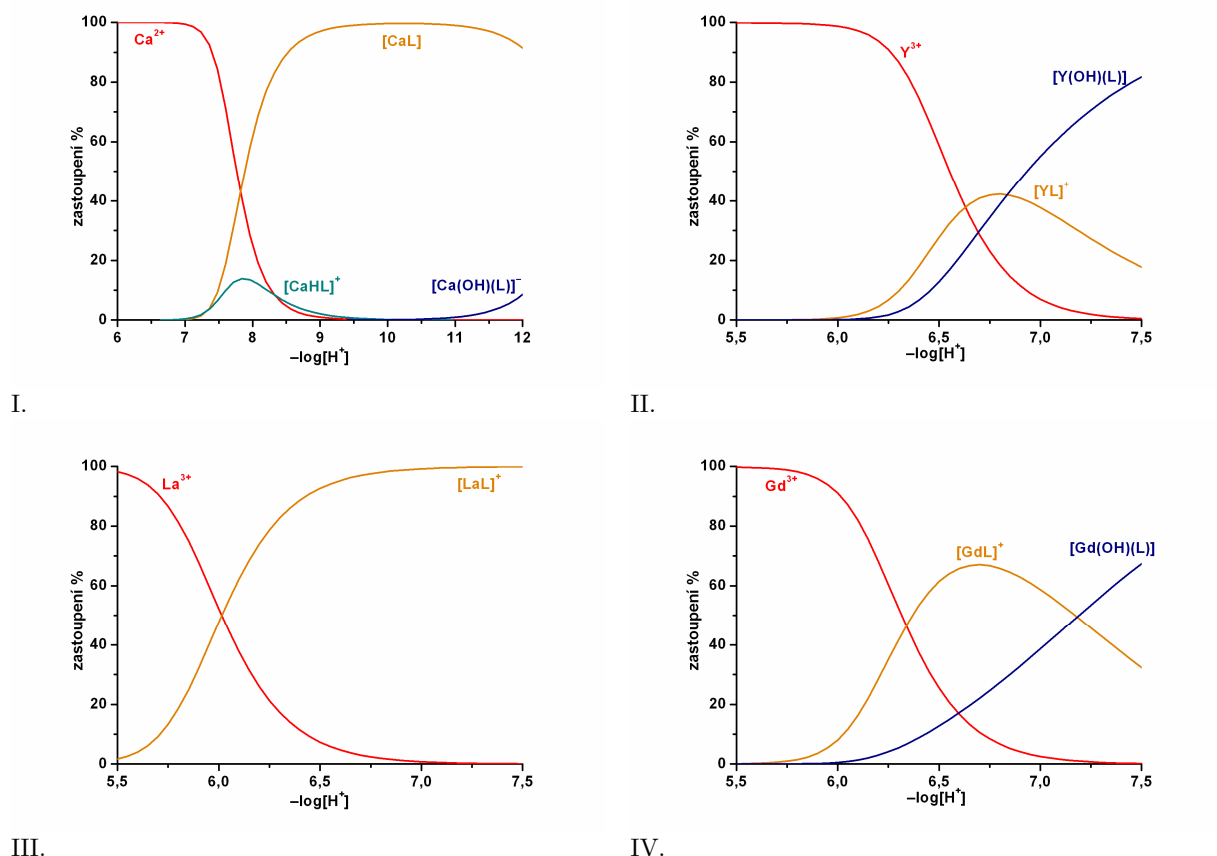
<sup>a</sup>  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$ , 25 °C. <sup>b</sup>  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$  nebo  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ , 25 °C lit.<sup>[59,60]</sup>.



**Obrázek 16:** Distribuční diagramy pro systémy **I.**  $\text{Ca}^{2+}$  **II.**  $\text{Y}^{3+}$  **III.**  $\text{La}^{3+}$  **IV.**  $\text{Gd}^{3+}$ :ligand  $\text{H}_3\text{L}^1$  1:1,  $c_{\text{M}} = c_{\text{L}} = 4 \text{ mM}$  ( $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$ ,  $25^\circ \text{C}$ ).

Potenciometrickou titrací systému  $\text{H}_2\text{L}^2:\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{H}_2\text{L}^2:\text{Gd}^{3+}$  a  $\text{H}_2\text{L}^2:\text{La}^{3+}$  1:1 byly z titračních dat programovým balíkem OPIUM určeny dvě, resp. jedna konstanta stability. Z dat získaných při potenciometrické titraci systému  $\text{H}_2\text{L}^2:\text{Ca}^{2+}$  1:1 byly určeny tři konstanty stability. Hodnota konstanty stability komplexní částice  $[\text{LaL}^2]^+$  je ve srovnání s konstantou stability komplexní částice  $[\text{GdL}^2]^+$  vyšší, což je nezvyklé (Tabulka 4). Důvodem může být fakt, že konstanty stability nemusí být ovlivněny pouze velikostí makrocyclického kruhu a iontovým poloměrem centrálního atomu, ale také velikostí dutiny, kterou tvoří pendantní ramena pro kation kovu. Vyšší určená hodnota konstanty stability komplexní částice  $[\text{LaL}^2]^+$  (ve srovnání s komplexní částicí  $[\text{GdL}^2]^+$ ) může být také způsobena větší afinitou měkčího iontu  $\text{La}^{3+}$  k dusíkovým atomům makrocyccklu oproti tvrdšímu iontu  $\text{Gd}^{3+}$ .

Dále je z tabulky (Tabulka 4) patrné, že konstanty stability komplexních částic ligandu  $\text{H}_2\text{L}^2$  s vybranými ionty kovů jsou nižší než v případě analogických komplexů s ligandem  $\text{H}_3\text{L}^1$ . U studovaných systémů  $\text{H}_2\text{L}^2:\text{Y}^{3+}$  a  $\text{H}_2\text{L}^2:\text{Gd}^{3+}$  1:1 navíc dochází již při poměrně nízkém pH ( $\text{pH} \sim 6,0$ ) k tvorbě hydroxidokomplexů. Z těchto důvodů nebyly komplexy ligandu  $\text{H}_2\text{L}^2$  dále studovány.



**Obrázek 17:** Distribuční diagramy pro systémy **I.**  $\text{Ca}^{2+}$ , **II.**  $\text{Y}^{3+}$  a **III.**  $\text{La}^{3+}$  **IV.**  $\text{Gd}^{3+}$ :ligand  $\text{H}_2\text{L}^2$  1:1,  $c_{\text{M}} = c_{\text{L}} = 4 \text{ mM}$  ( $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$ ,  $25^\circ \text{C}$ ).

#### 4.2.2 NMR titrace

Pro stanovení protonizačních konstant ligandů lze kromě potenciometrické titrace využít závislosti chemického posunu signálů v  $^1\text{H}$  NMR spektru na pH a stanovit tyto konstanty pomocí pH NMR titrace (protonizací atomu dusíku nebo kyslíku dochází ke změně stínících konstant a tedy i ke změně rezonanční frekvence sousedních jader). NMR titrace zároveň může sloužit k charakterizaci místa protonizace a k určení celkového protonizačního schématu ligandu.

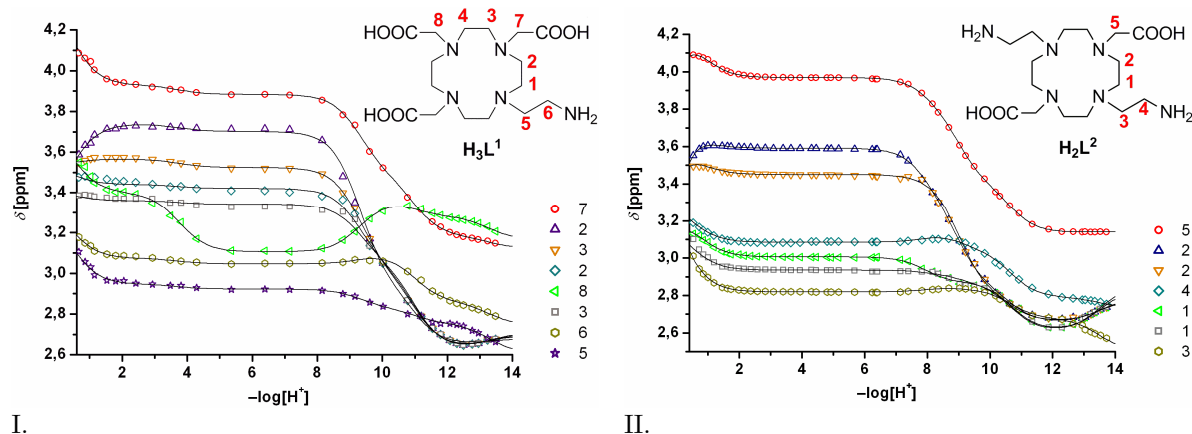
$^1\text{H}$  NMR titrace byla provedena u ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  a  $\text{H}_2\text{L}^2$  v rozsahu pH přibližně 0,5–13,5 bez kontroly iontové síly. Data získaná z těchto dvou titrací byla vyhodnocena pomocí programového balíku OPIUM. Nejlepší model pro výpočet protonizačních konstant ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  předpokládal v systému šest částic:  $(\text{H}_5\text{L}^1)^{2+}$ ,  $(\text{H}_4\text{L}^1)^+$ ,  $\text{H}_3\text{L}^1$ ,  $(\text{H}_2\text{L}^1)^-$ ,  $(\text{HL}^1)^{2-}$  a  $(\text{L}^1)^{3-}$ . Pro ligand  $\text{H}_3\text{L}^1$  bylo tedy získáno pět protonizačních konstant. Nejlepší model pro výpočet protonizačních konstant ligandu  $\text{H}_2\text{L}^2$  předpokládal v systému sedm částic:  $(\text{H}_6\text{L}^2)^{4+}$ ,  $(\text{H}_5\text{L}^2)^{3+}$ ,  $(\text{H}_4\text{L}^2)^{2+}$ ,  $(\text{H}_3\text{L}^2)^+$ ,  $\text{H}_2\text{L}^2$ ,  $(\text{HL}^2)^-$  a  $(\text{L}^2)^{2-}$ ; bylo tedy získáno šest protonizačních konstant. Extrémně nízká (šestá) protonizační konstanta byla ale určena s velkou chybou ( $\log\beta_6 - \log\beta_5 = \text{p}K_a(\text{H}_6\text{L}) = -0,52 \pm 1,48$ ), byla tedy použita pouze při optickém fitování dat, ale do výsledku nebyla zahrnuta. Tabulka 6

uvádí získané protonizační konstanty. Protonizační konstanty jsou v dobré shodě s konstantami určenými z dat získaných potenciometrickými titracemi. Drobné rozdíly mohou být způsobeny tím, že NMR titrace nebyla (na rozdíl od potenciometrické titrace) prováděna při konstantní iontové síle. U potenciometrické titrace je navíc před a po každém měření provedena kalibrační titrace elektrody, u NMR titrace byla provedena pouze kalibrace na pufr, která je méně přesná, zvláště pak při extrémních hodnotách pH. Do stanovení protonizačních konstant z NMR titrace mohlo vnést nepřesnosti také nepřesné odečtení chemických posunů signálů, které byly v některých oblastech pH rozšířené a překryté.

**Tabulka 6:** Hodnoty celkových protonizačních konstant a odpovídajících  $pK_a$  ligandů  $\mathbf{H_3L^1}$  a  $\mathbf{H_2L^2}$  vypočítaných programem OPIUM z dat získaných při NMR titracích (bez kontroly iontové síly, 25 °C). Pro přehlednost nejsou uvedeny náboje jednotlivých částic.

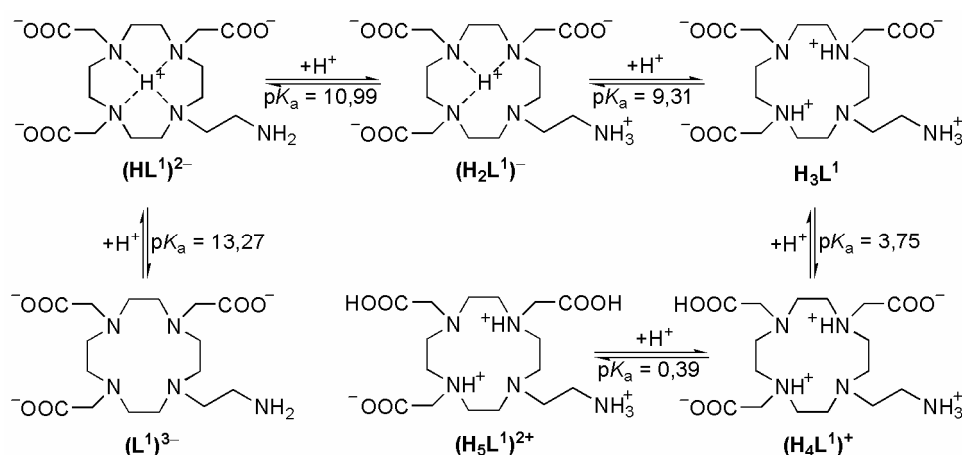
		$\mathbf{H_5L}$	$\mathbf{H_4L}$	$\mathbf{H_3L}$	$\mathbf{H_2L}$	$\mathbf{HL}$
$\mathbf{H_3L^1}$	$\log\beta$	37,71(36)	37,32(26)	33,57(24)	24,26(22)	13,27(19)
	$pK_a$	0,39	3,75	9,31	10,99	13,27
$\mathbf{H_2L^2}$	$\log\beta$	41,88(18)	41,13(10)	33,19(8)	24,15(7)	13,48(7)
	$pK_a$	0,75	7,94	9,04	10,67	13,48

Grafy závislosti chemických posunů některých signálů studovaných ligandů na pH uvádí Obrázek 18 (body získané z NMR titrace jsou nafitovány funkcí, která odpovídá modelu s vypočítanými protonizačními konstantami ze získaných dat). Některé signály ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$  nebylo možno sledovat v celém rozsahu pH (docházelo k překryvu s jinými signály a odečtení chemických posunů by mohlo být nepřesné), proto nebyly do výpočtu protonizačních konstant zahrnuty.



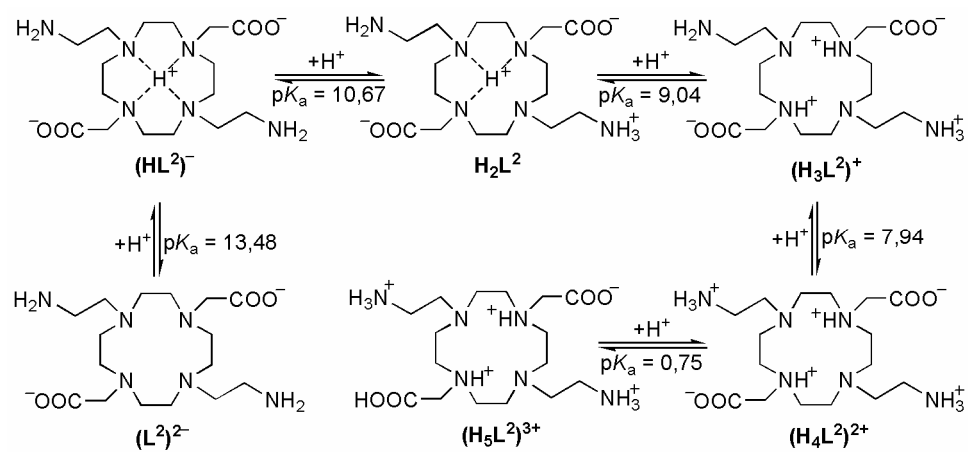
**Obrázek 18:** **I.** Závislost chemických posunů  $\delta_H$  některých signálů ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$  na pH v  $^1\text{H}$  NMR spektru ( $B_0 = 600$  MHz, 25 °C). Závislost  $\delta_H$  signálu **4** na pH nebyla do grafu (vzhledem k nesnadnému odečtení posunů z  $^1\text{H}$  NMR spekter) zanesena. **II.** Závislost chemických posunů  $\delta_H$  některých signálů ligandu  $\mathbf{H_2L^2}$  na pH v  $^1\text{H}$  NMR spektru ( $B_0 = 300$  MHz, 25 °C).

Z dat získaných z pH NMR titrací (Obrázek 18) lze určit přibližná protonizační schémata ligandů  $\mathbf{H_3L^1}$  a  $\mathbf{H_2L^2}$ . V případě ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$  souvisí první protonizační konstanta (odpovídající disociační konstantě  $pK_a(\text{HL}) = 13,27$ ) s protonizací makrocyklu, proton je distribuován rovnoměrně mezi dusíkovými atomy cyklu. Druhý přístupující proton (s odpovídající disociační konstantou  $pK_a(\text{H}_2\text{L}) = 10,99$ ) odpovídá protonizaci primárního aminu pendantního ramene. Třetí určená protonizační konstanta (odpovídající disociační konstantě  $pK_a(\text{H}_3\text{L}) = 9,31$ ) souvisí také s protonizací makrocyklu. Ze závislosti chemického posunu signálu **8** lze soudit, že se třetí přístupující proton (a současně i první přístupující proton původně distribuovaný mezi dusíkovými atomy cyklu) lokalizuje na jednom dusíkovém atomu makrocyklu (atom dusíku mezi atomy **2** a **3**). Předposlední stanovená protonizační konstanta (odpovídající disociační konstantě  $pK_a(\text{H}_4\text{L}) = 3,75$ ) odpovídá protonizaci acetátové skupiny pendantního ramene (jedná se o pendant s atomem **8**). Pátá a zároveň poslední určená protonizační konstanta (odpovídající disociační konstantě  $pK_a(\text{H}_5\text{L}) = 0,39$ ) souvisí s protonizací další karboxylové skupiny (Obrázek 19).



**Obrázek 19:** Protonizační schéma ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$ .

U ligandu  $\mathbf{H_2L^2}$  souvisí první dvě protonizační konstanty (odpovídající disociačním konstantám  $pK_a(\text{HL}) = 13,48$  a  $pK_a(\text{H}_2\text{L}) = 10,67$ ) také s protonizací makrocyklu, resp. protonizací primárního aminu pendantního ramene. Další dvě protonizační konstanty (odpovídající disociačním konstantám  $pK_a(\text{H}_3\text{L}) = 9,04$  a  $pK_a(\text{H}_4\text{L}) = 7,94$ ) souvisí s protonizací makrocyklu a druhého primárního aminu (hodnoty  $pK_a$  jsou blízko sebe, protonizace makrocyklu a aminu probíhají pravděpodobně současně). Poslední určená (tj. pátá) protonizační konstanta (odpovídající disociační konstantě  $pK_a(\text{H}_5\text{L}) = 0,75$ ) souvisí s protonizací jedné acetátové skupiny (Obrázek 20).

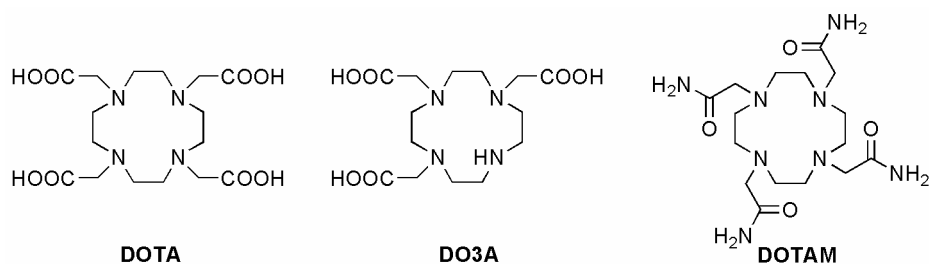


Obrázek 20: Protonizační schéma ligandu  $\text{H}_2\text{L}^2$ .

### 4.2.3 Studium izomerie komplexů v roztocích

#### Komplexy ligandu $\text{H}_3\text{L}^1$

Izomerie SA/TSA (Square Antiprism a Twisted Square Antiprism) byla u komplexů ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  studována pomocí  $^1\text{H}$  NMR spekter roztoků europitého a ytterbitého komplexu. Diastereoizomery SA a TSA je obvykle možné v  $^1\text{H}$  NMR spektrech rozlišit díky rozdílu chemických posunů některých signálů, který indukuje přítomný lanthanoid. Tento efekt, tzv. LIS (Lanthanide Induced Shift), závisí na orientaci měřeného jádra vzhledem k magnetické ose komplexu a na vzdálenosti od centrálního atomu. U ligandů odvozených od ligandu DOTA se s iontovým poloměrem lanthanoidu mění i zastoupení izomerů SA a TSA, přičemž izomer TSA je preferován pro komplexy s lanthanoidy ze začátku lanthanoidové řady. Molární frakce izomeru TSA (resp. SA) u  $\text{Ln}^{3+}$  komplexů ligandu DOTA klesá (resp. roste) od  $\text{La}^{3+}$  k  $\text{Er}^{3+}$ . Komplexy (La-Pr)-DOTA<sup>-</sup> existují výhradně v podobě TSA izomeru, komplex Nd-DOTA<sup>-</sup> se vyskytuje ve formě SA:TSA přibližně 1:1, komplex Er-DOTA<sup>-</sup> je zastoupen výhradně izomerem SA). S dalším zmenšujícím se poloměrem  $\text{Ln}^{3+}$  iontu komplexu (tj. od  $\text{Er}^{3+}$  k  $\text{Lu}^{3+}$ ) dochází v případech komplexů některých ligandů vzhledem k tvorbě izomeru TSA' k poklesu zastoupení SA izomeru (jako izomer TSA' se označuje izomer TSA bez molekuly vody koordinované k centrálnímu atomu)<sup>[44]</sup>. Rozdíly chemických posunů izomerů SA a TSA se nejlépe pozorují na axiálních vodíkových atomech cyklu, tyto protony poskytují signály s nejvyšším chemickým posunem. K analýze typu izomerie jsou vhodné také protony pendantních skupin (izomery SA a TSA se liší mimo jiné právě v natočení pendantních ramen), chemické posuny těchto protonů jsou pozorovány v záporné oblasti spektra (ppm).



**Obrázek 21:** Struktury ligandů zmiňovaných v textu.

Naměřená  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{Eu-L}^1$  a  $\text{Yb-L}^1$  (Příloha 3: Obrázek 36 a Obrázek 37) jsou vzhledem k nesymetrii komplexů velmi nepřehledná, dochází k překryvu jednotlivých signálů. Spektra byla porovnána se spektry europitých a ytterbitých komplexů ligandů DOTA a DOTAM (Obrázek 21)<sup>[45,28,56]</sup>. V případě komplexu  $\text{Yb-L}^1$  lze díky posunu axiálních protonů cyklu a umístění Yb na konci lanthanoidové řady určit, že se pravděpodobně jedná o izomer SA. V případě komplexu  $\text{Eu-L}^1$  nelze druh izomeru určit jednoznačně, protože signály axiálních protonů cyklu se nacházejí na rozhraní mezi obvyklým výskytem těchto signálů SA a TSA



izomerů. Velmi pravděpodobně se jedná o směs těchto dvou izomerů, která je obvyklá u  $\text{Eu}^{3+}$  komplexů ligandu DOTA a derivátů DO3A.

V  $^1\text{H}$  NMR spektrech ytterbitého i europitého komplexu ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  je možné se zvyšující se teplotou sledovat postupné zmenšování celkového rozsahu chemických posunů jednotlivých signálů. Se zvyšující se teplotou dochází ke zrychlení překlápění pendantních ramen a k inverzi makrocyclu, dochází tedy k postupnému průměrování hodnot chemických posunů příslušných párů atomů.

### Komplexy ligandů $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$ a $\text{H}_3\text{L}^12\text{Me}$

Izomerie SA/TSA byla u komplexů ligandů  $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$  a  $\text{H}_3\text{L}^12\text{Me}$  studována pomocí  $^1\text{H}$  NMR spekter roztoků europitých a ytterbitých komplexů při teplotě 0 a 25 °C. V porovnání s  $^1\text{H}$  NMR spektry komplexů  $\text{Eu-L}^1$  a  $\text{Yb-L}^1$  měřeními při stejných teplotách jsou signály ve spektrech analogických komplexů ligandů  $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$  a  $\text{H}_3\text{L}^12\text{Me}$  rozlišenější. To může být způsobeno buď poněkud rigidnějším, nebo naopak labilnějším uspořádáním pendantních ramen okolo iontu  $\text{Ln}^{3+}$  (tj. rigidním nebo flexibilním chováním komplexů v porovnání s časovou kálou NMR). Komplex  $\text{Yb-L}^1\text{Me}$  (resp.  $\text{Yb-L}^12\text{Me}$ ) poskytoval při teplotách 0 °C a 25 °C téměř identická  $^1\text{H}$  NMR spektra, proto jsou uvedena pouze spektra měřená při teplotě 25 °C (Příloha 3: Obrázek 38 a Obrázek 40).

Z chemických posunů a rozsahu  $^1\text{H}$  NMR signálů komplexu  $\text{Yb-L}^1\text{Me}$  se lze domnívat, že by se pravděpodobně mohlo jednat o izomer TSA', přítomnost izomeru SA ale vzhledem ke špatnému rozlišení a velké pološířce signálů nelze vyloučit. Preference izomeru TSA' u  $\text{Yb-L}^1\text{Me}$  může být (ve srovnání se stereochemií SA pozorovanou u komplexu  $\text{Yb-L}^1$ ) způsobená objemnějším pendantním ramenem s methylovou skupinou, které pravděpodobně omezuje přístup molekuly vody a preferuje tak oktakoordinované uspořádání TSA' (izomery TSA' se obvykle vyskytují u ytterbitých komplexů DOTA-like ligandů s objemnými pendantními rameny<sup>[61,62]</sup>). Z chemických posunů a rozsahu  $^1\text{H}$  NMR signálů komplexu  $\text{Yb-L}^12\text{Me}$  se zdá, že by se pravděpodobně mohlo jednat o směs izomerů SA a TSA'. Přestože se jedná o komplex s objemnějším pendantním ramenem než v případě komplexu  $\text{Yb-L}^1\text{Me}$  a z tohoto důvodu by se dal očekávat preferenční vznik izomeru TSA', koordinační vazba terciárního aminu k centrálnímu atomu je delší než analogická vazba sekundárního aminu komplexu  $\text{Yb-L}^1\text{Me}$  a umožňuje tedy koordinaci vody a vznik nonakoordinovaného uspořádání SA.

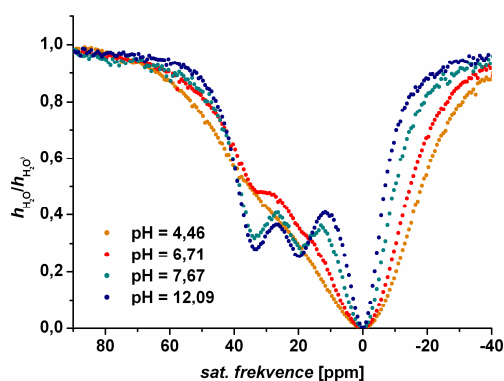
Signály axiálních protonů cyklu europitých komplexů ligandů  $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$  a  $\text{H}_3\text{L}^12\text{Me}$  (Příloha 3: Obrázek 39, Obrázek 41) se nacházejí na rozhraní mezi obvyklým výskytem těchto signálů SA a TSA izomerů. Nelze tedy jednoznačně říci, o který izomer se jedná. Opět se s velkou pravděpodobností jedná o směs těchto dvou izomerů.

#### 4.2.4 CEST experimenty (měření Z-spekter)

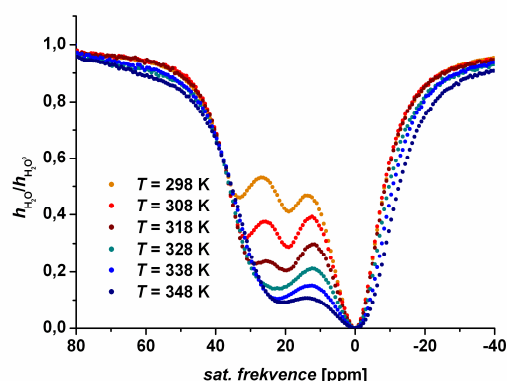
CEST (resp. PARACEST) experimenty byly provedeny s roztoky europitých a ytterbitých komplexů ligandů  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$ ,  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1\text{Me}$  a  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^12\text{Me}$ , příprava těchto roztoků je popsána výše (Kapitola 3.4.5). Byly změřeny závislosti efektu CEST na pH, na teplotě a v některých případech byla změřena i závislost CEST efektu na intenzitě presaturačního pulzu.

##### Komplexy ligandu $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$

Europitý komplex ligandu  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$  poskytuje efekt CEST dvou protonů primárního aminu pendantní skupiny (při teplotě 25 °C) v oblastech +34 ppm a +19,5 ppm (vzhledem k  $\delta_v = 0$  ppm). Ze závislosti efektu CEST vyměnitelných protonů tohoto komplexu na pH je patrné, že intenzita efektu CEST roste se vzrůstajícím počtem částic s koordinovanou aminovou skupinou pendantního ramene (jen pro srovnání: konsektivní disociační konstanta  $pK_a$  určená z potenciometrické titrace systému  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1:\text{Gd}^{3+}$  (1:1), která odpovídá deprotonizaci protonizovaného primárního aminu komplexní částice  $(\text{Gd-HL}^1)^+$  a následné koordinaci primárního aminu k centrálnímu atomu  $\text{Gd}^{3+}$ , je  $pK_a(\text{HLM}) = 5,82$ ).



I.



II.

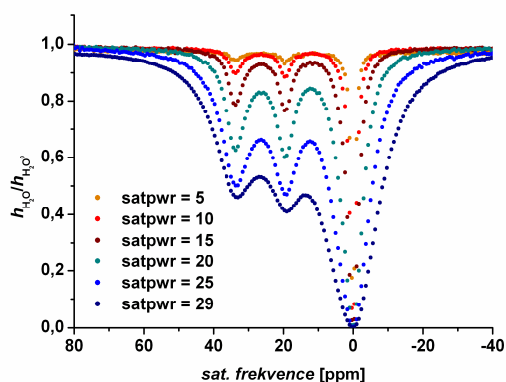
**Obrázek 22:** I. Závislost Z-spekter komplexu  $\text{Eu-L}^1$  (0,08M roztok ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  1:10) na pH.  $B_0 = 300$  MHz,  $T = 298$  K, satpwr = 29 dB, satdly = 2 s, krok 200 Hz. II. Závislost Z-spekter komplexu  $\text{Eu-L}^1$  (0,05M roztok ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  1:10) na teplotě; pH = 7,4,  $B_0 = 300$  MHz, satpwr = 29 dB, satdly = 2 s, krok 200 Hz.

Ze Z-spektra (Obrázek 22-I.) je patrné, že při nižších studovaných hodnotách pH ( $\text{pH} = 4,5\text{--}7$ ) k přenosu saturace dochází (lze tak soudit podle nesymetrického tvaru signálu odpovídajícího presaturaci „volné“ vody), ale po zvýšení pH studovaného roztoku komplexu  $\text{Eu-L}^1$  je efekt CEST intenzivnější a je možné rozlišit CEST-signály dvou vyměnitelných protonů. Při dalším zvýšení pH ( $\text{pH} = 8\text{--}12,1$ ) se již intenzita efektu CEST nemění (pro přehlednost nejsou všechna studovaná pH v grafu uvedena).

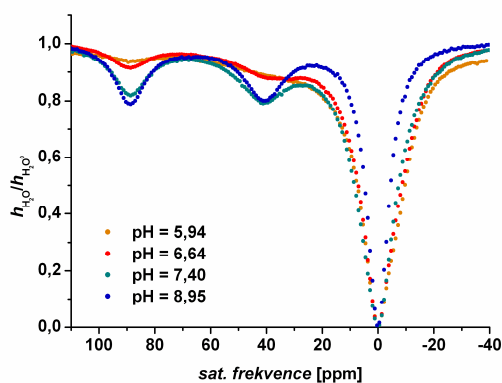
Se zvyšující se teplotou roztoku komplexu  $\text{Eu-L}^1$  (Obrázek 22-II.) se mění tvar naměřených Z-spekter. S rostoucí teplotou dochází k postupnému přibližování dvou CEST-signálů vyměnitelných protonů aminu. Teplota koalescence těchto signálů je přibližně 50 °C. Se zvyšující se teplotou zároveň dochází ke zrychlení chemické výměny mezi protony vody a protony aminové skupiny, CEST signály vyměnitelných protonů se tedy přibližují k signálu, který odpovídá presaturaci vody.

Z-spektra roztoku komplexu  $\text{Eu-L}^1$  byla také studována v závislosti na intenzitě presaturačního pulzu (tzv. „saturation power“, udávaný v jednotkách dB). Z obrázku (Obrázek 23) je patrný nárůst CEST efektu se zvyšující se intenzitou presaturace. Zároveň je vidět, že CEST-efekt vyměnitelných protonů komplexu  $\text{Eu-L}^1$  je možné pozorovat i při nízkých intenzitách presaturačních pulzů, což je důležité pro případné aplikace v MRI.

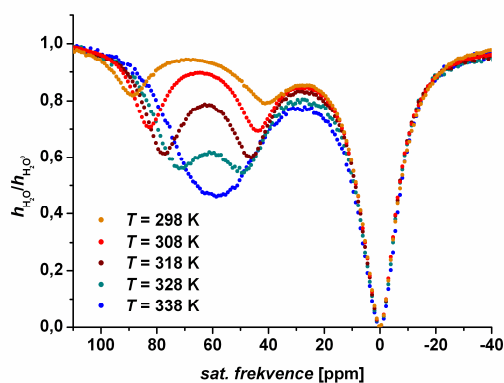
Stejně jako europitý komplex, tak i ytterbitý komplex ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  poskytuje efekt CEST dvou vyměnitelných protonů primárního aminu pendantního ramene. Tyto vyměnitelné protony se u ytterbitého komplexu (při teplotě 25 °C) nacházejí v oblastech s vyšším chemickým posunem (přibližně +89 ppm a +42 ppm).



**Obrázek 23:** Závislost Z-spekter komplexu  $\text{Eu-L}^1$  (0,05M roztok ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  1:10) na satpwr; pH = 7,4,  $B_0 = 300$  MHz,  $T = 298$  K, satdly = 2 s, krok 200 Hz.



I.



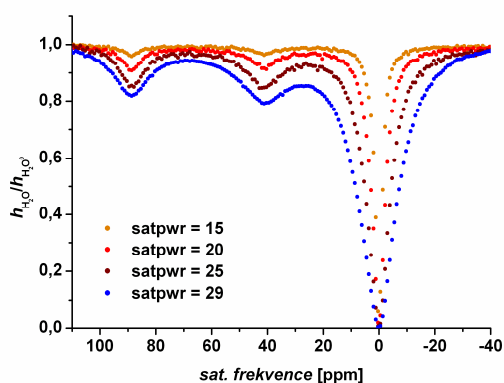
II.

**Obrázek 24:** I. Závislost Z-spekter komplexu  $\text{Yb-L}^1$  (0,1M roztok ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  1:10) na pH.  $B_0 = 300$  MHz,  $T = 298$  K, satpwr = 29 dB, satdly = 2 s, krok 250 Hz. II. Závislost Z-spekter komplexu  $\text{Yb-L}^1$  (0,09M roztok ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  1:10) na teplotě; pH = 7,4,  $B_0 = 300$  MHz, satpwr = 29 dB, satdly = 2 s, krok 250 Hz.

Ze závislosti efektu CEST vyměnitelných protonů tohoto komplexu na pH (Obrázek 24-I.) je opět patrné, že intenzita efektu CEST narůstá se vzrůstajícím počtem částic s koordinovaným aminem pendantního ramene v systému. V nejvyšší studované oblasti pH (tj. přibližně

pH = 7,8–9) roztoku komplexu  $\text{Yb-L}^1$  již k nárůstu intenzity efektu CEST nedochází. Se zvyšující se teplotou roztoku komplexu  $\text{Yb-L}^1$  (Obrázek 24-II.) se opět mění tvar Z-spekter. S nárůstem teploty dochází k postupnému vzájemnému přibližování CEST-signálů vyměnitelných protonů primárního aminu, teplota koalescence těchto signálů je přibližně 65 °C. Dochází ke zrychlení výměny protonů mezi molekulami vody a protony aminové skupiny a CEST-signály se přibližují k signálu, který odpovídá presaturaci vody. Zároveň s rostoucí teplotou (stejně jako v případě teplotní závislosti Z-spekter roztoku  $\text{Eu-L}^1$ ) dochází k nárůstu intenzity efektu CEST. To je pravděpodobně způsobeno právě zrychlením chemické výměny mezi protony vody a protony aminové skupiny, které má za následek zvýšení efektivity přenosu saturace.

Byla také studována Z-spektra roztoku  $\text{Yb-L}^1$  (pH = 7,4) v závislosti na intenzitě presaturačního pulzu. Z obrázku (Obrázek 25) je patrný nárůst CEST efektu se zvyšující se intenzitou presaturace. V porovnání se závislostí Z-spekter  $\text{Eu-L}^1$  na stejném parametru je vidět, že CEST-efekt vyměnitelných protonů komplexu  $\text{Yb-L}^1$  není tak intenzivní a již při satpwr = 15 přestává být zřetelný, přestože se jedná o téměř dvojnásobně koncentrovanější roztok.

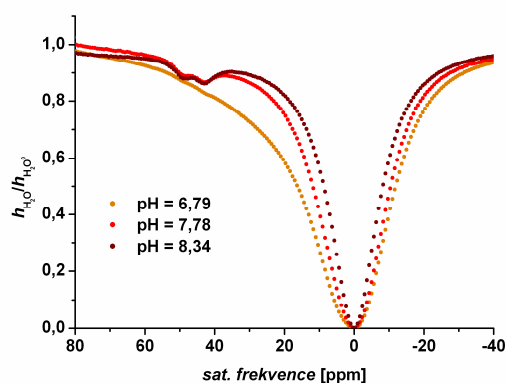


**Obrázek 25:** Závislost Z-spekter komplexu  $\text{Yb-L}^1$  (0,09M roztok ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  1:10) na satpwr; pH = 7,4,  $B_0 = 300$  MHz,  $T = 298$  K, satdly = 2 s, krok 250 Hz.

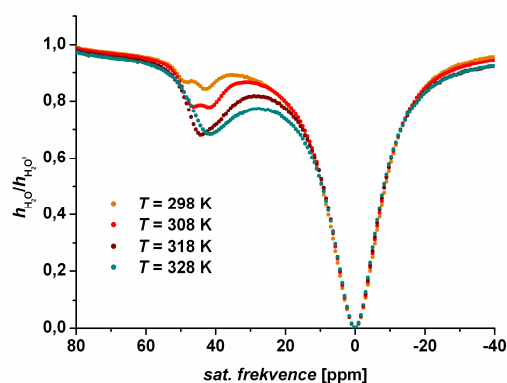
### Komplexy ligandu $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$

Pro interpretaci efektu CEST komplexů  $\text{Eu-L}^1$  a  $\text{Yb-L}^1$  byly též studovány europité a ytterbité komplexy ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$  a  $\text{H}_3\text{L}^2\text{Me}$ .

CEST experimenty provedené s roztoky europitého komplexu ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$  vedly k překvapivým výsledkům (Obrázek 26). Místo jednoho očekávaného CEST-signálu vyměnitelného protonu sekundárního aminu byly v Z-spektru pozorovány dva (ve srovnání se Z-spektry komplexu  $\text{Eu-L}^1$ ) velmi blízké CEST-signály s velkým chemickým posunem (+43 ppm a +49,5 ppm). Závislosti Z-spekter komplexu  $\text{Eu-L}^1\text{Me}$  na pH a teplotě vykazují stejné trendy jako závislosti Z-spekter předchozích diskutovaných komplexů. Se zvyšující se teplotou dochází k vzájemnému přibližování CEST-signálů, zároveň dochází k posunu těchto signálů směrem k signálu vody.



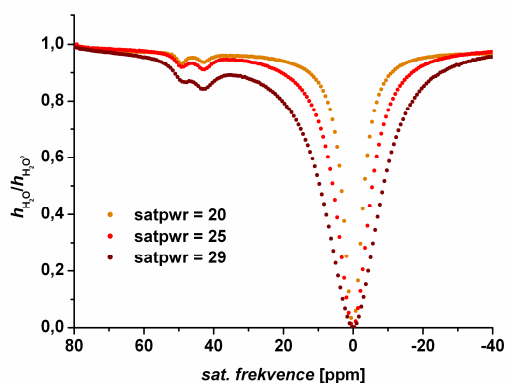
I.



II.

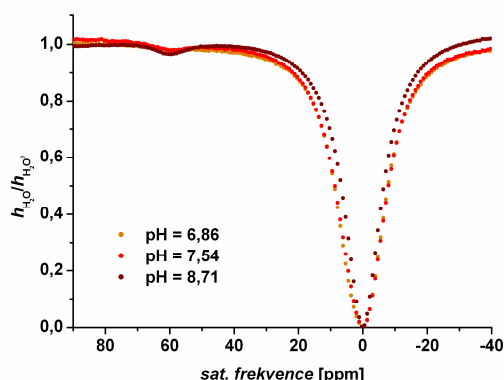
**Obrázek 26:** I. Závislost Z-spekter komplexu Eu-**L¹Me** (0,025M roztok ve směsi H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 1:10) na pH.  $B_0 = 300$  MHz,  $T = 298$  K, satpwr = 29 dB, satdly = 2 s, krok 200 Hz. II. Závislost Z-spekter komplexu Eu-**L¹** (0,05M roztok ve směsi H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 1:10) na teplotě; pH = 8,16,  $B_0 = 300$  MHz, satpwr = 29 dB, satdly = 2 s, krok 200 Hz.

Pro lepší rozlišení dvou blízkých CEST-signálů byla naměřena také závislost Z-spekter roztoku Eu-**L¹Me** na intenzitě presaturačního pulzu. Ze Z-spektra při hodnotě satpwr = 20, kdy CEST signály komplexu Eu-**L¹Me** nejsou ještě ovlivněny presaturací vody, je možné pozorovat, že tvar těchto CEST-signálů není zcela identický. Mohlo by se jednat o signály dvou izomerů komplexu Eu-**L¹Me** (např. směs izomerů SA a TSA nebo směs izomerů s protonem aminové skupiny v axiální nebo ekvatoriální poloze vzhledem k -CH<sub>3</sub> skupině), které se vyskytují v roztoku.

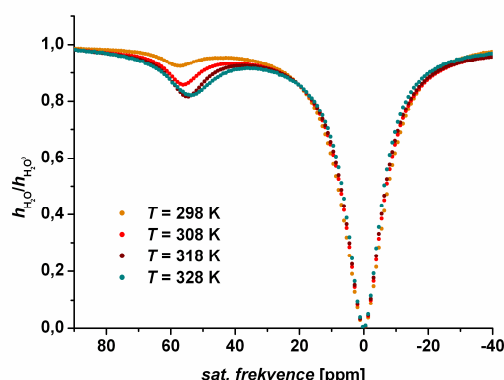


**Obrázek 27:** Závislost Z-spekter komplexu Eu-**L¹Me** (0,05M roztok ve směsi H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 1:10) na satpwr; pH = 8,16,  $B_0 = 300$  MHz,  $T = 298$  K, satdly = 2 s, krok 250 Hz.

Ytterbitý komplex ligandu **H<sub>3</sub>L¹Me** poskytuje podle očekávání efekt CEST jednoho protonu primárního aminu pendantní skupiny při teplotě 25 °C v oblasti +57 ppm (tj. v oblasti mezi CEST-signály dvou protonů NH<sub>2</sub> komplexu Yb-**L¹**). Ze Z-spekter (Obrázek 28) je patrné, že naměřený CEST efekt je v porovnání s CEST efektem komplexu Yb-**L¹** (Obrázek 24) výrazně méně intenzivní, což lze ale očekávat vzhledem k nižší koncentraci měřených roztoků (I. 0,025M a II. 0,05M). Ze závislosti Z-spekter roztoku komplexu Yb-**L¹Me** na teplotě je opět patrné, že s rostoucí teplotou dochází k nárůstu intenzity efektu CEST a k postupnému mírnému přibližování CEST-signálu vyměnitelného protonu k signálu, který odpovídá presaturaci vody v roztoku.



I.



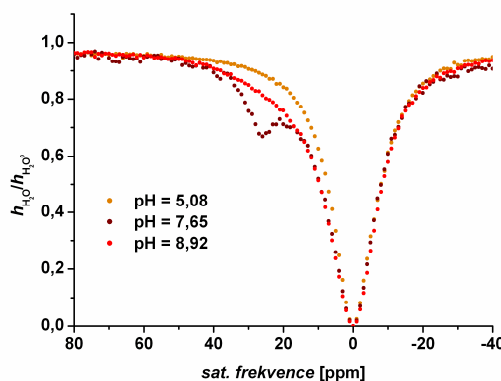
II.

**Obrázek 28:** I. Závislost Z-spekter komplexu Yb-LMe<sup>1</sup> (0,025M roztok ve směsi H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 1:10) na pH.  $B_0 = 300$  MHz,  $T = 298$  K, satpwr = 29 dB, satdly = 2 s, krok 250 Hz. II. Závislost Z-spekter komplexu Yb-LMe<sup>1</sup> (0,05M roztok ve směsi H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 1:10) na teplotě; pH = 8,35,  $B_0 = 300$  MHz, satpwr = 29 dB, satdly = 2 s, krok 250 Hz.

### Komplexy ligandu H<sub>3</sub>L<sup>1</sup>2Me

Byla studována Z-spektra roztoku Eu-L<sup>1</sup>2Me při pH = 5–9 ( $B_0 = 300$  MHz,  $T = 298$  K, satpwr = 29 dB, satdly = 2 s, krok 200 Hz). Takto naměřená Z-spektra obsahovala pouze signál odpovídající presaturaci vody, jiný CEST-signal dle očekávání naměřen nebyl.

Dále byla studována Z-spektra roztoku Yb-L<sup>1</sup>2Me (Obrázek 29) při pH = 5–9. V nejkyselější studované oblasti pH obsahovala naměřená Z-spektra pouze symetrický signál odpovídající presaturaci signálu vody. Po obazičtění roztoku (pH = 7,38 a pH = 7,65) byla při teplotě 25 °C naměřena Z-spektra s CEST signálem v oblasti +26 ppm. Po dalším obazičtění roztoku komplexu Yb-L<sup>1</sup>2Me (pH = 8,92) bylo naměřeno Z-spektrum obsahující opět pouze (poněkud nesymetrický) signál odpovídající presaturaci vody. Ve srovnání



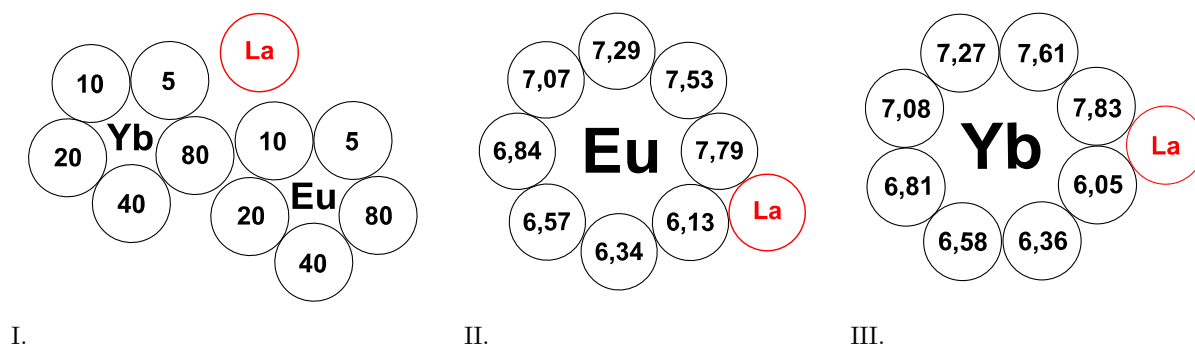
**Obrázek 29:** pH-závislost Z-spekter komplexu Yb-L<sup>1</sup>2Me (0,05M roztok ve směsi H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 1:10).  $B_0 = 300$  MHz,  $T = 298$  K, satdly = 2 s, krok 250 Hz.

s CEST-signály dříve diskutovaných ytterbitých komplexů se naměřený CEST-signal komplexu Yb-L<sup>1</sup>2Me nachází v oblasti s mnohem nižším chemickým posunem. Zároveň se tento signál objevuje v takové oblasti pH, ve které je očekávána deprotonizace a následná koordinace sekundárního aminu pendantního ramene k centrálnímu atomu kovu. Na rozdíl od ostatních studovaných komplexů s postupným obazičtčováním roztoku tento CEST-signal ze Z-spektra mizí.

CEST signál je tedy patrně způsoben protonem protonizované aminové skupiny nekoordinovaného pendantního ramene, který je v optimálně rychlé chemické výměně s protony molekul vody.

#### 4.2.5 MRI studie efektu CEST

MRI studie efektu CEST (resp. PARACEST) byly provedeny s roztoky europitých a ytterbitých komplexů ligandu  $\mathbf{H}_3\mathbf{L}^1$  na pracovišti v IKEM. Příprava měřených roztoků je popsána výše (Kapitola 3.4.5). Byl studován efekt CEST v závislosti na koncentraci a hodnotě pH měřených roztoků. Pro každý fantom byly získány dva  $T_1$  vážené obrázky měřené pulzní sekvencí **a)** s presaturačním pulzem o frekvenci vyměnitelného protonu zjištěné ze Z-spektru (F ppm), **b)** s presaturačním pulzem o frekvenci odpovídající  $-F$  ppm, tj. mimo rezonanci vyměnitelného protonu, ale se stejným efektem na signál vody, který byl referencován na 0 ppm. Odečtením takto získaných obrázků byl získán obrázek rozdílový, nejsvětlejší oblasti rozdílového obrázku tedy odpovídají nejintenzivnějšímu efektu CEST. Jako kontrolní vzorek byl použit 80mM roztok komplexu  $\text{La-L}^1$ . Geometrii měřených roztoků, koncentrace a hodnoty pH uvádí Obrázek 30.

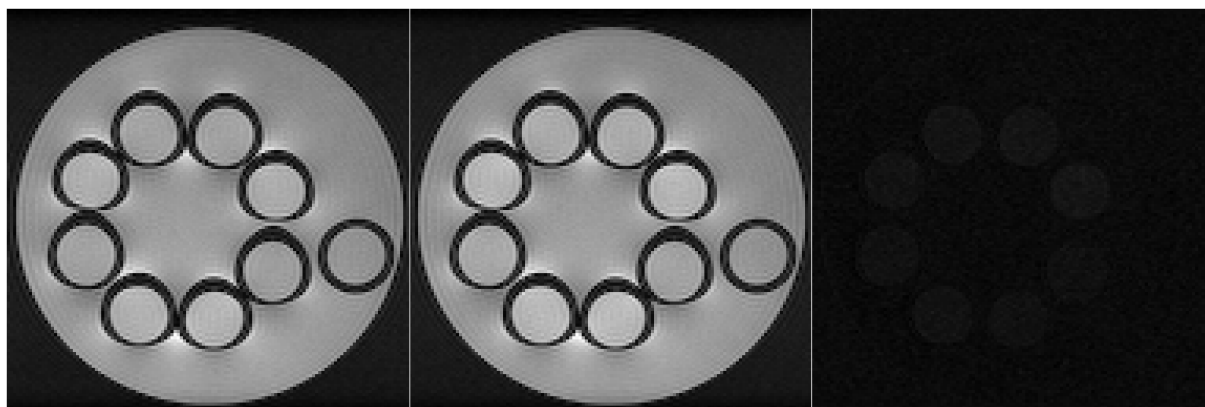


**Obrázek 30:** **I.** Přibližná geometrie měřených fantomů obsahujících roztoky  $\text{Eu-L}^1$  a  $\text{Yb-L}^1$  o různých koncentracích (5, 10, 20, 40 a 80mM). **II.** Geometrie měřených fantomů obsahujících 80mM roztoky  $\text{Eu-L}^1$  o různé hodnotě pH. **III.** Geometrie měřených fantomů obsahujících 80mM roztoky  $\text{Yb-L}^1$  o různé hodnotě pH.

Byl studován efekt CEST 80mM roztoků komplexu  $\text{Eu-L}^1$  v závislosti na hodnotě pH ( $\text{pH} = 6,13\text{--}7,79$ ). Při aplikaci presaturačního pulzu o frekvenci +34 ppm (tj. frekvence jednoho vyměnitelného protonu aminové skupiny  $\text{Eu-L}^1$  komplexu) je z obrázku (Obrázek 31) patrné, že s rostoucí hodnotou pH dochází k nárůstu efektu CEST. V případě roztoků komplexu  $\text{Yb-L}^1$  ( $\text{pH} = 6,05\text{--}7,83$ ) byl při aplikaci presaturačního pulzu o frekvenci +89 ppm (tj. frekvence jednoho vyměnitelného protonu aminové skupiny  $\text{Yb-L}^1$  komplexu) pozorován stejný trend (Obrázek 32). Ve srovnání s roztoky  $\text{Eu-L}^1$  byl pozorovaný CEST efekt roztoků  $\text{Yb-L}^1$  výrazně méně intenzivní, což bylo ukázáno již v dříve diskutovaných Z-spektrech naměřených s roztoky těchto komplexů.



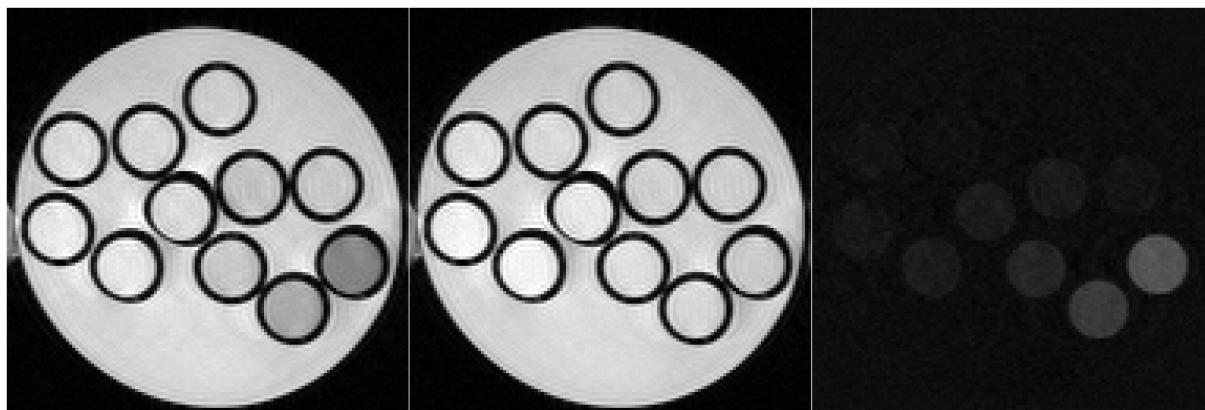
I. II. III.  
**Obrázek 31:** CEST obrázky fantomu obsahujícího 80mM roztoky komplexu  $\text{Eu-L}^1$  v  $\text{H}_2\text{O}$  o různé hodnotě pH; pulzní sekvence MSME,  $B_0 = 4,7 \text{ T}$ ,  $B_1 = 20 \mu\text{T}$ ,  $T = 293 \text{ K}$ ,  $\text{satdly} = 2 \text{ s}$ ,  $\text{TR} = 5 \text{ s}$ ,  $\text{TE} = 8,9 \text{ ms}$ . **I.**  $T_1$  vážený snímek,  $\text{satfrq} = 34 \text{ ppm}$  (vzhledem k  $\delta_v = 0 \text{ ppm}$ ); **II.**  $T_1$  vážený snímek,  $\text{satfrq} = -34 \text{ ppm}$  (vzhledem k  $\delta_v = 0 \text{ ppm}$ ), **III.** Rozdílový obrázek získaný odečtením obrázků **I.** a **II.**



I. II. III.  
**Obrázek 32:** CEST obrázky fantomu obsahujícího 80mM roztoky komplexu  $\text{Yb-L}^1$  v  $\text{H}_2\text{O}$  o různé hodnotě pH; pulzní sekvence MSME,  $B_0 = 4,7 \text{ T}$ ,  $B_1 = 20 \mu\text{T}$ ,  $T = 293 \text{ K}$ ,  $\text{satdly} = 2 \text{ s}$ ,  $\text{TR} = 5 \text{ s}$ ,  $\text{TE} = 8,9 \text{ ms}$ . **I.**  $T_1$  vážený snímek,  $\text{satfrq} = 89 \text{ ppm}$  (vzhledem k  $\delta_v = 0 \text{ ppm}$ ); **II.**  $T_1$  vážený snímek,  $\text{satfrq} = -89 \text{ ppm}$  (vzhledem k  $\delta_v = 0 \text{ ppm}$ ), **III.** Rozdílový obrázek získaný odečtením obrázků **I.** a **II.**

Byl také studován efekt CEST roztoků komplexů  $\text{Eu-L}^1$  a  $\text{Yb-L}^1$  v závislosti na koncentraci ( $c = 5\text{--}80 \text{ mM}$ ). Při aplikaci presaturačního pulzu o frekvenci  $+34 \text{ ppm}$  (Obrázek 33) odpovídající rezonanční frekvenci výměnitelného protonu komplexu  $\text{Eu-L}^1$ , která je blízká rezonanční frekvenci výměnitelného protonu komplexu  $\text{Yb-L}^1$  ( $+42 \text{ ppm}$ ), je možné sledovat, že dochází k „rozsvícení“ fantomu s roztoky  $\text{Eu-L}^1$  (s rostoucí koncentrací roste efekt CEST), zároveň dochází i k „rozsvícení“ fantomu s roztoky komplexu  $\text{Yb-L}^1$ . Při aplikaci presaturačního pulzu o frekvenci  $+89 \text{ ppm}$  (Obrázek 34) odpovídající rezonanční frekvenci výměnitelného protonu komplexu  $\text{Yb-L}^1$ , je efekt CEST dle očekávání pozorovatelný pouze u fantomu s roztoky komplexu  $\text{Yb-L}^1$ .



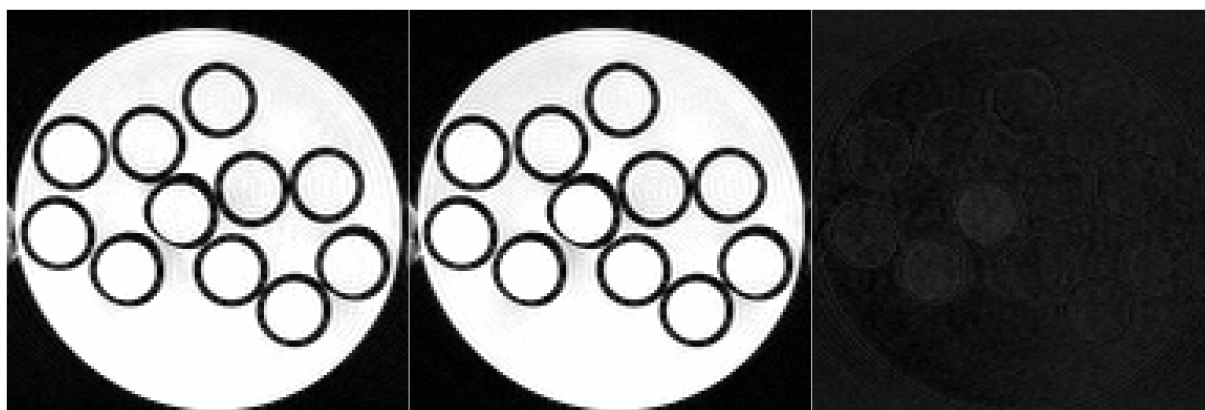


I.

II.

III.

**Obrázek 33:** CEST obrázky fantomů obsahujících roztoky komplexů  $\text{Eu-L}^1$  a  $\text{Yb-L}^1$  v  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{pH} = 7,4$ ) o různé koncentraci; pulzní sekvence RARE,  $B_0 = 4,7 \text{ T}$ ,  $B_1 = 20 \mu\text{T}$ ,  $T = 293 \text{ K}$ ,  $\text{satdly} = 2 \text{ s}$ ,  $\text{TR} = 5 \text{ s}$ ,  $\text{TE} = 8,9 \text{ ms}$ . **I.**  $T_1$  vážený snímek,  $\text{satfrq} = 34 \text{ ppm}$  (vzhledem k  $\delta_v = 0 \text{ ppm}$ ); **II.**  $T_1$  vážený snímek,  $\text{satfrq} = -34 \text{ ppm}$  (vzhledem k  $\delta_v = 0 \text{ ppm}$ ), **III.** Rozdílový obrázek získaný odečtením obrázků **I.** a **II.**



I.

II.

III.

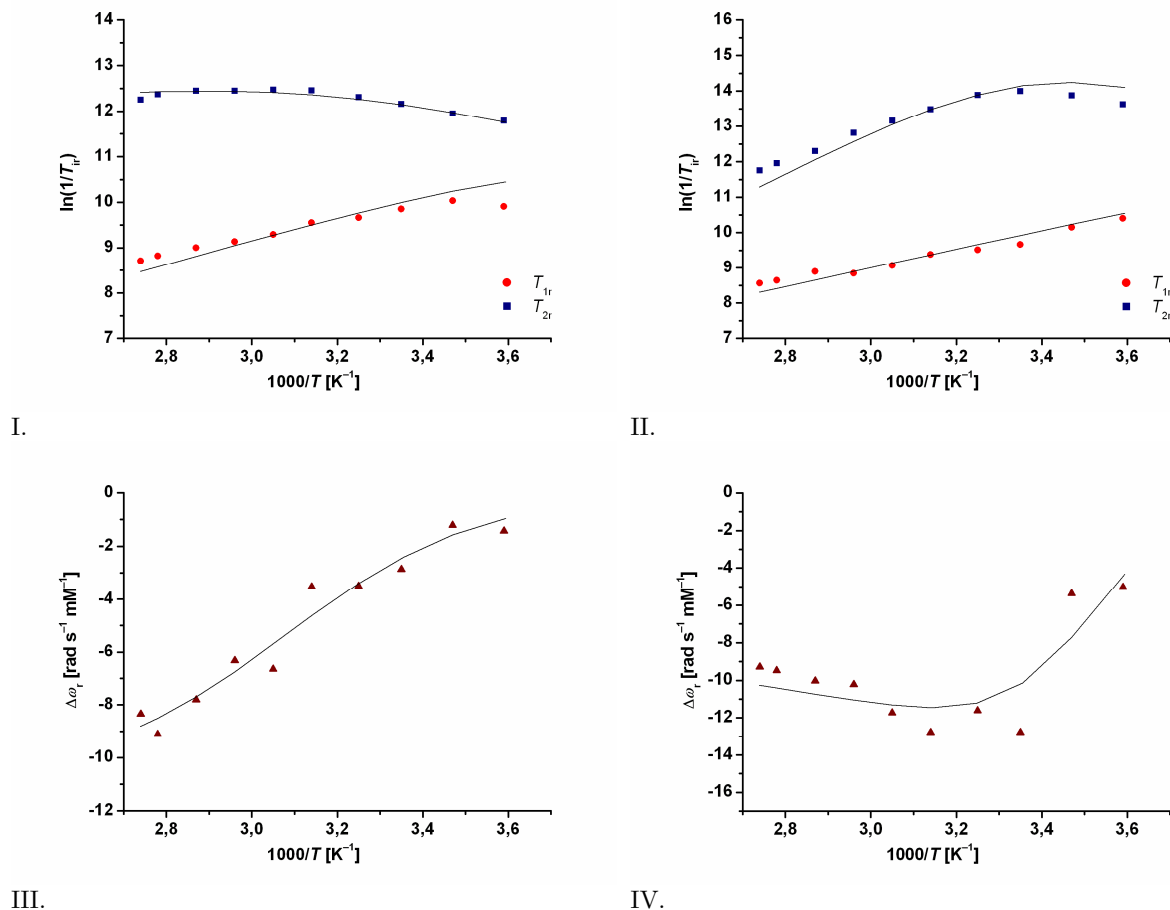
**Obrázek 34:** CEST obrázky fantomů obsahujících roztoky komplexů  $\text{Eu-L}^1$  a  $\text{Yb-L}^1$  v  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{pH} = 7,4$ ) o různé koncentraci; pulzní sekvence RARE,  $B_0 = 4,7 \text{ T}$ ,  $B_1 = 20 \mu\text{T}$ ,  $T = 293 \text{ K}$ ,  $\text{satdly} = 2 \text{ s}$ ,  $\text{TR} = 5 \text{ s}$ ,  $\text{TE} = 8,9 \text{ ms}$ . **I.**  $T_1$  vážený snímek,  $\text{satfrq} = 89 \text{ ppm}$  (vzhledem k  $\delta_v = 0 \text{ ppm}$ ); **II.**  $T_1$  vážený snímek,  $\text{satfrq} = -89 \text{ ppm}$  (vzhledem k  $\delta_v = 0 \text{ ppm}$ ), **III.** Rozdílový obrázek získaný odečtením obrázků **I.** a **II.**

#### 4.2.6 Teplotní $^{17}\text{O}$ NMR experimenty

Byly změřeny teplotní závislosti  $T_1$  a  $T_2$   $^{17}\text{O}$  relaxačních časů a chemických posunů  $^{17}\text{O}$  signálu vody v roztoku gadolinitých komplexů ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  při  $\text{pH} = 4,9$  a  $\text{pH} = 8,9$  a v roztoku reference při  $\text{pH} = 4,9$  (u těchto roztoků byla zároveň měřena také  $^1\text{H}$  NMR spektra). Chemické posuny  $^{17}\text{O}$  signálů vody v roztocích  $\text{Gd}^{3+}$  komplexů byly korigovány na chemický posun vody v referenci a na příspěvek BMS, korekce na diamagnetický příspěvek nebyla provedena. Molární zlomek koordinované vody  $P_m$  byl vypočten za předpokladu poměru  $\text{Gd}^{3+}:\text{H}_2\text{O}$  1:1 pro roztok komplexu o  $\text{pH} = 8,9$  ( $q = 1$ ), při  $\text{pH} = 4,9$  byl uvažován poměr  $\text{Gd}^{3+}:\text{H}_2\text{O}$  1:2 ( $q = 2$ )<sup>[63]</sup>.

Obrázek 35 uvádí závislosti  $\ln(1/T_{1r})$  a  $\ln(1/T_{2r})$  redukovaných  $^{17}\text{O}$  relaxačních rychlostí a  $^{17}\text{O}$  redukovaných angulárních frekvencí  $\Delta\omega_r$  [ $\Delta\omega_r = (\omega_r - \omega_v)/55,56 P_m$ ] na teplotě. Všechna

proložení experimentálních dat jsou výsledkem společného vypřesňovacího procesu. Experimentální data  $^{17}\text{O}$  redukovaných angulárních frekvencí jsou zatížena velkou statistickou chybou. Tato chyba ale vyplývá z podstaty měření. Relativně nízká shoda experimentálně určených bodů s fitem je u tohoto typu experimentu běžná a je srovnatelná s literaturou<sup>[40]</sup>.



**Obrázek 35:** I., II. Teplotní závislost logaritmu redukovaných  $^{17}\text{O}$  relaxačních rychlostí vody v roztoku  $\text{Gd}^{3+}$  komplexu ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  (pH = 4,9, resp. 8,9). III., IV. Teplotní závislost  $^{17}\text{O}$  redukovaných angulárních frekvencí  $\Delta\omega_i$  (pH = 4,9, resp. 8,9).

Při zpracování dat z měření  $^{17}\text{O}$  teplotních závislostí nebyl do modelu zahrnut příspěvek vnější koordinační sféry ani příspěvek druhé koordinační sféry. Aktivační energie rotačního korelačního času  $E_r$  byla při výpočtu fixována na hodnotu  $22 \text{ kJ mol}^{-1}$ , aktivační energie pro modulaci ZFS interakce (**Z**ero **F**ield **S**plitting, tj. rozštěp elektronických hladin v nulovém magnetickém poli) byla fixována na hodnotu  $E_v = 1 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Vzdálenosti mezi iontem  $\text{Gd}^{3+}$  a kyslíkovým, resp. vodíkovým atomem koordinované vody a nejkratší vzdálenost pro přístup molekul vnější sféry ke  $\text{Gd}^{3+}$  iontu byly fixovány na hodnoty  $r_{\text{GdO}} = 2,5 \text{ \AA}$ ,  $r_{\text{GdH}} = 3,1 \text{ \AA}$  a  $A = 3,5 \text{ \AA}$ . Počet přímo koordinovaných molekul vody k centrálnímu iontu  $\text{Gd}^{3+}$  byl také fixován. Fixované parametry byly převzaty z průměrných hodnot uváděných pro tento typ komplexů<sup>[40,63,64,65]</sup>.

Byl určen rezidenční čas molekul vody ve vnitřní koordinační sféře  $\tau_m$  a rotační korelační čas  $\tau_R$ . Dále pak aktivační enthalpie výměny vody  $\Delta H^\ddagger$ , konstanta hyperjemného štěpení mezi jádrem  $^{17}\text{O}$  a nepárovými elektrony  $\text{Gd}^{3+}$  iontu  $A/\hbar$ , kvadrát stopy tenzoru ZFS  $\Delta^2$  a korelační čas modulace ZFS interakce  $\tau_v^{298}$ . Získané hodnoty parametrů jsou pouze odhady, pro přesné určení bude v budoucnu nutné zahrnout do výpočtu data z  $^1\text{H}$  NMRD profilů, tj. ze závislosti relaxivity  $^1\text{H}$  roztoku  $\text{Gd-L}^1$  na síle magnetického pole. Tabulka 7 shrnuje výsledky fitování, pro porovnání jsou uvedeny i parametry určené pro gadolinitý komplex ligandu DOTA.

**Tabulka 7:** Porovnání parametrů gadolinitých komplexů ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  (pH = 4,9 nebo 8,9) získaných z matematického zpracování  $^{17}\text{O}$  a  $^1\text{H}$  NMR dat (příspěvek vnější a druhé hydratační sféry byl zanedbán) s parametry komplexu  $\text{Gd-DOTA}^-$ . Parametry, které jsou v tabulce podtrženy, byly při výpočtu fixovány.

Parametr	$(\text{Gd-HL}^1)^+$ pH = 4,9	$\text{Gd-L}^1$ pH = 8,9	$(\text{Gd-DOTA})^-^a$
$\Delta^2 [10^{20} \text{ s}^{-2}]$	3	1,7	0,16
$\tau_m^{298} [\text{ns}]$	3930	120	244
$\Delta H^\ddagger [\text{kJ mol}^{-1}]$	17	55	49,8
$\tau_R^{298} [\text{ps}]$	131	68	77
$E_r [\text{kJ mol}^{-1}]$	22	22	16,1
$\tau_v^{298} [\text{ps}]$	5,1	6,3	11
$E_v [\text{kJ mol}^{-1}]$	1	1	1,0
$A/\hbar [10^6 \text{ rad s}^{-1}]$	-2,0	-3,2	-3,7
$r_{\text{GdO}} [\text{\AA}]$	2,5	2,5	2,38
$r_{\text{GdH}} [\text{\AA}]$	3,1	3,1	–
$A [\text{\AA}]$	3,5	3,5	–
$q$	2	1	1

<sup>a</sup> Převzato z lit.<sup>[40]</sup>.

Rezidenční čas vody ve vnitřní koordinační sféře je u komplexu  $\text{Gd-L}^1$  při pH = 8,9, kdy je aminová skupina pendantního ramene koordinovaná k centrálnímu atomu kovu,  $\tau_m = 120$  ns. Výměna vody je tedy ve srovnání s komplexem  $\text{Gd-DOTA}^-$  přibližně  $2\times$  rychlejší. Při nižší hodnotě pH (pH = 4,9) komplexu  $\text{Gd-L}^1$ , resp.  $(\text{Gd-HL}^1)^+$ , kdy pendantní rameno není k centrálnímu atomu koordinováno, je rezidenční čas vody výrazně delší ( $\tau_m = 3930$  ns). Rychlost výměny vody je tedy ve srovnání s komplexem  $\text{Gd-DOTA}^-$  přibližně  $16\times$  menší. Koordinační místo vody není v případě  $(\text{Gd-HL}^1)^+$  stéricky bráněno a disociace molekuly vody z první koordinační sféry je pomalá. Dalo by se očekávat, že rezidenční čas vody bude u komplexní částice  $(\text{Gd-HL}^1)^+$  podobný jako u komplexu  $\text{Gd-DO3A}$  ( $\tau_{m,\text{Gd-DO3A}} = 160$  ns)<sup>[66]</sup>. Na rozdíl od komplexu  $\text{Gd-DO3A}$  je ale díky protonizované skupině primárního aminu  $(\text{Gd-HL}^1)^+$  výměna vody zpomalena pravděpodobně tvorbou vodíkových můstků.

Hodnoty rotačního korelačního času  $\tau_R^{298}$  jsou pro  $\text{Gd-DOTA}^-$  a  $\text{Gd-L}^1$  (pH = 8,9) podobné, což lze očekávat vzhledem k podobnosti komplexů (přibližně stejná hmotnost a velikost). Parametry  $\Delta^2$  a  $\tau_v^{298}$  souvisí se symetrií rozložení náboje kolem centrálního atomu. U komplexů  $\text{Gd-L}^1$  byla ve srovnání s  $\text{Gd-DOTA}^-$  určena větší, resp. menší hodnota těchto

parametrů, což je v souladu se snížením symetrie komplexu  $\text{Gd-L}^1$  oproti  $\text{Gd-DOTA}^-$  a tedy i se snížením symetrie rozložení elektronové hustoty na centrálním atomu.

## 5 ZÁVĚR

V rámci této práce byly připraveny čtyři ligandy  $\mathbf{H_3L^1}$ ,  $\mathbf{H_2L^2}$ ,  $\mathbf{H_3L^1Me}$  a  $\mathbf{H_3L^12Me}$  s primárními, sekundárními a terciárními aminovými skupinami na koordinujících se pendantních ramenech. Tyto látky byly charakterizovány pomocí  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR a MS(ESI). U ligandů  $\mathbf{H_3L^1}$  a  $\mathbf{H_2L^2}$  byla provedena také elementární analýza, struktura těchto ligandů byla navíc potvrzena pomocí rentgenostrukturní analýzy.

Pomocí  $^1\text{H}$  pH NMR titrace a potenciometrické titrace bylo studováno acidobazické chování ligandů  $\mathbf{H_3L^1}$  a  $\mathbf{H_2L^2}$ . Pomocí potenciometrických titrací byly též stanoveny konstanty stability komplexů těchto ligandů s ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  a  $\text{Gd}^{3+}$ . Z důvodů nízkých hodnot konstant stability komplexních částic ligandu  $\mathbf{H_2L^2}$  s vybranými ionty kovů a tvorbě hydroxidokomplexů již při poměrně nízkém pH (pH~6,0) nebyly komplexy ligandu  $\mathbf{H_2L^2}$  dále studovány.

Na roztocích komplexů (z hlediska efektu CEST) dříve studovaného ligandu DOTAM byly optimalizovány parametry pulzní sekvence pro měření presaturačních (CEST) experimentů. Byly připraveny ytterbité a europité komplexy ligandů  $\mathbf{H_3L^1}$ ,  $\mathbf{H_3L^1Me}$  a  $\mathbf{H_3L^12Me}$ . U roztoků těchto komplexů byly poté pomocí optimalizované pulzní sekvence studovány možnosti přenosu saturace ze signálu vyměnitelného protonu daného komplexu na signál  $\text{H}_2\text{O}$  v roztoku v závislosti na pH, teplotě a v některých případech i na intenzitě presaturačního pulzu. Z CEST experimentů bylo zjištěno, že vyměnitelné protony primárního (resp. sekundárního) aminu europitého a ytterbitého komplexu ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$  a  $\mathbf{H_3L^1Me}$  jsou v široké oblasti pH v optimálně rychlé (resp. pomalé) chemické výměně s protony vody v roztoku a v Z-spektrech je možné pozorovat jejich CEST-signály, k přenosu saturace tedy dochází. V případě europitého a ytterbitého komplexu ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$  byly v Z-spektrech pozorovány dva signály dvou vyměnitelných protonů aminové skupiny. Tyto protony (axiální/ekvatoriální) jsou rozlišitelné díky koordinaci pendantního ramene k centrálnímu atomu kovu. V případě ytterbitého komplexu ligandu  $\mathbf{H_3L^1Me}$  byl v Z-spektrech dle očekávání pozorován pouze jeden signál. Europitý komplex ligandu  $\mathbf{H_3L^1Me}$  poskytoval v Z-spektrech dva blízké CEST-signály, mohlo by se jednat o signály dvou izomerů tohoto komplexu, které se vyskytují v roztoku (izomery SA a TSA nebo izomery s protonem aminové skupiny v axiální nebo ekvatoriální poloze vzhledem k methylové skupině). U  $\text{Yb}^{3+}$  komplexu ligandu  $\mathbf{H_3L^12Me}$  s koordinujícím se terciárním aminem pendantního ramene byl pozorován efekt CEST v úzké oblasti pH. Tento CEST efekt s velkou pravděpodobností odpovídá přenosu saturace z protonu protonizované aminové skupiny nekoordinovaného pendantního ramene. Závislost efektu CEST  $\text{Eu}^{3+}$  a  $\text{Yb}^{3+}$  komplexů ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$  na pH a koncentraci daného roztoku byla také studována pomocí MRI scanneru na pracovišti v IKEM.

Pomocí teplotních  $^{17}\text{O}$  NMR experimentů byla studována rychlost výměny molekul vody ve vnitřní koordinační sféře gadolinitého komplexu ligandu  $\mathbf{H_3L^1}$  při dvou hodnotách pH, při kterých

by měla být koordinovaná/dekoordinovaná aminová skupina pendantního ramene. U komplexu  $\text{Gd-L}^1$  s koordinovaným aminem pendantního ramene byla ve srovnání s komplexem  $\text{Gd-DOTA}^-$  zjištěna přibližně  $2\times$  větší rychlost výměny vody. V případě komplexní částice  $(\text{Gd-HL}^1)^+$  s protonizovanou a dekoordinovanou aminovou skupinou pendantního ramene byla zjištěna přibližně  $16\times$  pomalejší výměna vody než u komplexu  $\text{Gd-DOTA}^-$ .

## 6 PŘÍLOHY

**Příloha 1:** Krystalografická data studovaných ligandů  $\mathbf{H_3L^1}$  a  $\mathbf{H_2L^2}$ .

Ligand	$\mathbf{H_3L^1 \cdot 5H_2O}$	$\mathbf{H_2L^2 \cdot 2HCl \cdot 2,5H_2O}$
Vzorec	$\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_4 \cdot 2\text{HCl} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$
$M_r$	479,54	492,45
Rozměry (mm)	0,21×0,28×0,81	0,11×0,20×0,47
Barva a tvar	bezbarvá jehlička	bezbarvá destička
Krystalografická soustava	monoklinická	monoklinická
Prostorová grupa	$P2_1/c$	$C2/c$
$a$ (Å)	7,8038(1)	22,9251(9)
$b$ (Å)	16,7236(3)	16,9159(7)
$c$ (Å)	17,8081(3)	15,3588(6)
$\alpha$ (°)	90,00	90,00
$\beta$ (°)	92,124(2)	129,798(1)
$\gamma$ (°)	90,00	90,00
$U$ (Å <sup>3</sup> )	2322,47(6)	4891,0(3)
$Z$	4	8
$D_{\text{calc.}}$ (g cm <sup>-3</sup> )	1,371	1,338
$\lambda$ (Å)	0,71073	0,71073
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0,115	0,310
$T$ (K)	150	150
Rozsah $\theta$ (°)	1,67–27,59	1,62–27,04
Total refl.	5358	5367
Obsd. refl. ( $I > 2\sigma(I)$ )	4408	3676
GOF on $F^2$	1,034	1,018
$R$ ; $wR$ ( $I > 2\sigma(I)$ )	0,0344; 0,0814	0,0475; 0,1170
$R_{\text{all}}$ ; $wR_{\text{all}}$	0,0462; 0,0873	0,0823; 0,1360
$\Delta\rho_{\text{max/min}}$ (e Å <sup>-3</sup> )	0,299/−0,214	0,534/−0,644

**Příloha 2:** Rovnice použité při fitování dat získaných z  $^1\text{H}$  pH NMR titrací (pro přehlednost jsou vynechány náboje jednotlivých částic).

### Šestičástečkový systém „ $\text{H}_5\text{L}$ “

$$[\text{L}] + [\text{HL}] + [\text{H}_2\text{L}] + [\text{H}_3\text{L}] + [\text{H}_4\text{L}] + [\text{H}_5\text{L}] = 1 \quad (100 \%)$$

$$K_1 = \frac{[\text{H}] \cdot [\text{L}]}{[\text{HL}]} \quad K_2 = \frac{[\text{H}] \cdot [\text{HL}]}{[\text{H}_2\text{L}]} \quad K_3 = \frac{[\text{H}] \cdot [\text{H}_2\text{L}]}{[\text{H}_3\text{L}]} \quad K_4 = \frac{[\text{H}] \cdot [\text{H}_3\text{L}]}{[\text{H}_4\text{L}]} \quad K_5 = \frac{[\text{H}] \cdot [\text{H}_4\text{L}]}{[\text{H}_5\text{L}]}$$

$$[\text{L}] = \frac{1}{1 + \frac{[\text{H}]}{K_1} + \frac{[\text{H}]^2}{K_1 \cdot K_2} + \frac{[\text{H}]^3}{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3} + \frac{[\text{H}]^4}{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4} + \frac{[\text{H}]^5}{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5}}$$

$$[\text{HL}] = \frac{1}{\frac{K_1}{[\text{H}]} + 1 + \frac{[\text{H}]}{K_2} + \frac{[\text{H}]^2}{K_2 \cdot K_3} + \frac{[\text{H}]^3}{K_2 \cdot K_3 \cdot K_4} + \frac{[\text{H}]^4}{K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5}}$$

$$[\text{H}_2\text{L}] = \frac{1}{\frac{K_1 \cdot K_2}{[\text{H}]^2} + \frac{K_2}{[\text{H}]} + 1 + \frac{[\text{H}]}{K_3} + \frac{[\text{H}]^2}{K_3 \cdot K_4} + \frac{[\text{H}]^3}{K_3 \cdot K_4 \cdot K_5}}$$

$$[\text{H}_3\text{L}] = \frac{1}{\frac{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3}{[\text{H}]^3} + \frac{K_2 \cdot K_3}{[\text{H}]^2} + \frac{K_3}{[\text{H}]} + 1 + \frac{[\text{H}]}{K_4} + \frac{[\text{H}]^2}{K_4 \cdot K_5}}$$

$$[\text{H}_4\text{L}] = \frac{1}{\frac{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4}{[\text{H}]^4} + \frac{K_2 \cdot K_3 \cdot K_4}{[\text{H}]^3} + \frac{K_3 \cdot K_4}{[\text{H}]^2} + \frac{K_4}{[\text{H}]} + 1 + \frac{[\text{H}]}{K_5}}$$

$$[\text{H}_5\text{L}] = \frac{1}{\frac{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5}{[\text{H}]^5} + \frac{K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5}{[\text{H}]^4} + \frac{K_3 \cdot K_4 \cdot K_5}{[\text{H}]^3} + \frac{K_4 \cdot K_5}{[\text{H}]^2} + \frac{K_5}{[\text{H}]} + 1}$$

### Sedmičástečkový systém „ $\text{H}_6\text{L}$ “

$$[\text{L}] + [\text{HL}] + [\text{H}_2\text{L}] + [\text{H}_3\text{L}] + [\text{H}_4\text{L}] + [\text{H}_5\text{L}] + [\text{H}_6\text{L}] = 1 \quad (100 \%)$$

$$K_1 = \frac{[\text{H}] \cdot [\text{L}]}{[\text{HL}]} \quad K_2 = \frac{[\text{H}] \cdot [\text{HL}]}{[\text{H}_2\text{L}]} \quad K_3 = \frac{[\text{H}] \cdot [\text{H}_2\text{L}]}{[\text{H}_3\text{L}]} \quad K_4 = \frac{[\text{H}] \cdot [\text{H}_3\text{L}]}{[\text{H}_4\text{L}]} \quad K_5 = \frac{[\text{H}] \cdot [\text{H}_4\text{L}]}{[\text{H}_5\text{L}]} \quad K_6 = \frac{[\text{H}] \cdot [\text{H}_5\text{L}]}{[\text{H}_6\text{L}]}$$

$$[\text{L}] = \frac{1}{1 + \frac{[\text{H}]}{K_1} + \frac{[\text{H}]^2}{K_1 \cdot K_2} + \frac{[\text{H}]^3}{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3} + \frac{[\text{H}]^4}{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4} + \frac{[\text{H}]^5}{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5} + \frac{[\text{H}]^6}{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5 \cdot K_6}}$$



$$[\text{HL}] = \frac{1}{\frac{K_1}{[\text{H}]} + 1 + \frac{[\text{H}]}{K_2} + \frac{[\text{H}]^2}{K_2 \cdot K_3} + \frac{[\text{H}]^3}{K_2 \cdot K_3 \cdot K_4} + \frac{[\text{H}]^4}{K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5} + \frac{[\text{H}]^5}{K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5 \cdot K_6}}$$

$$[\text{H}_2\text{L}] = \frac{1}{\frac{K_1 \cdot K_2}{[\text{H}]^2} + \frac{K_2}{[\text{H}]} + 1 + \frac{[\text{H}]}{K_3} + \frac{[\text{H}]^2}{K_3 \cdot K_4} + \frac{[\text{H}]^3}{K_3 \cdot K_4 \cdot K_5} + \frac{[\text{H}]^4}{K_3 \cdot K_4 \cdot K_5 \cdot K_6}}$$

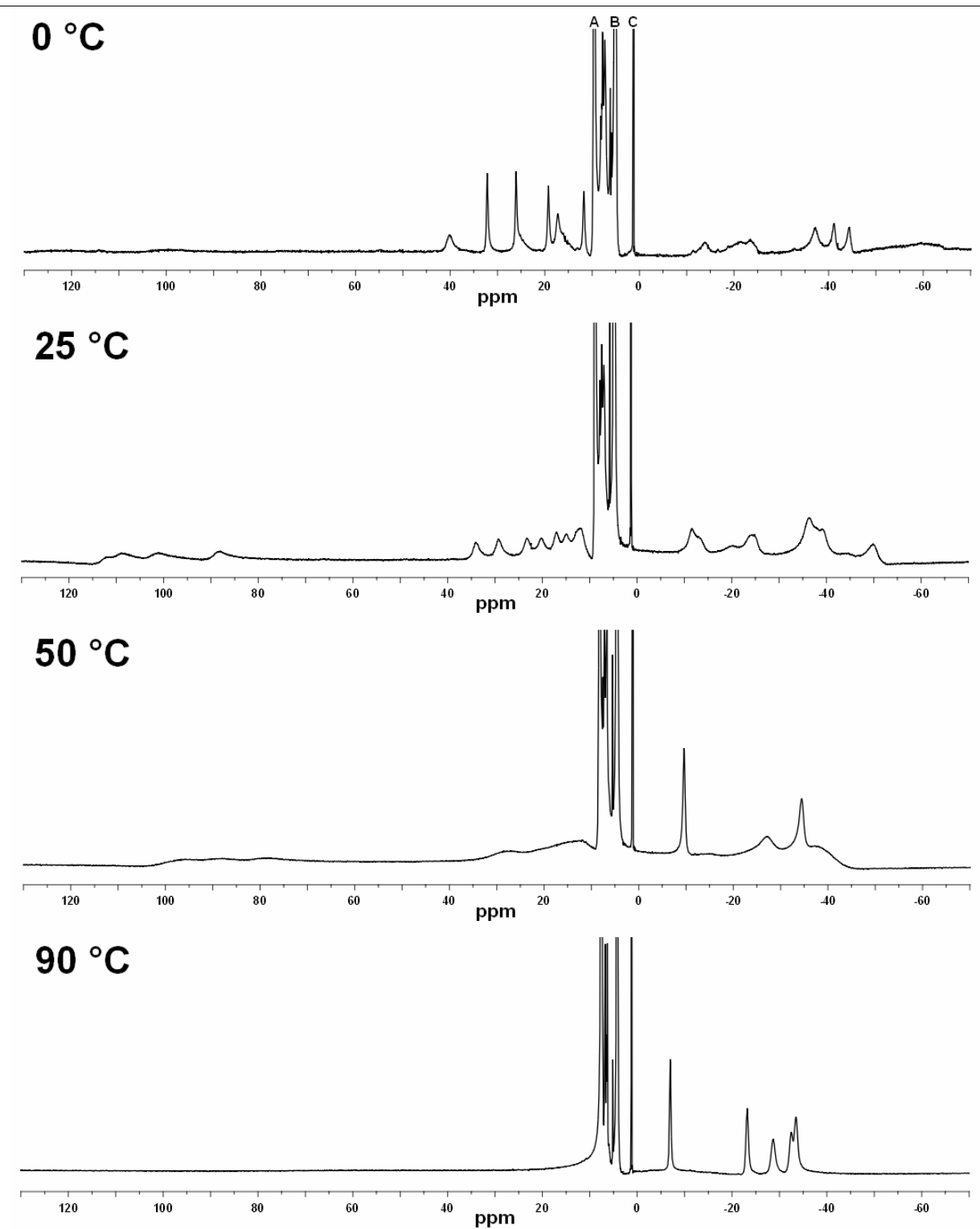
$$[\text{H}_3\text{L}] = \frac{1}{\frac{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3}{[\text{H}]^3} + \frac{K_2 \cdot K_3}{[\text{H}]^2} + \frac{K_3}{[\text{H}]} + 1 + \frac{[\text{H}]}{K_4} + \frac{[\text{H}]^2}{K_4 \cdot K_5} + \frac{[\text{H}]^3}{K_4 \cdot K_5 \cdot K_6}}$$

$$[\text{H}_4\text{L}] = \frac{1}{\frac{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4}{[\text{H}]^4} + \frac{K_2 \cdot K_3 \cdot K_4}{[\text{H}]^3} + \frac{K_3 \cdot K_4}{[\text{H}]^2} + \frac{K_4}{[\text{H}]} + 1 + \frac{[\text{H}]}{K_5} + \frac{[\text{H}]^2}{K_5 \cdot K_6}}$$

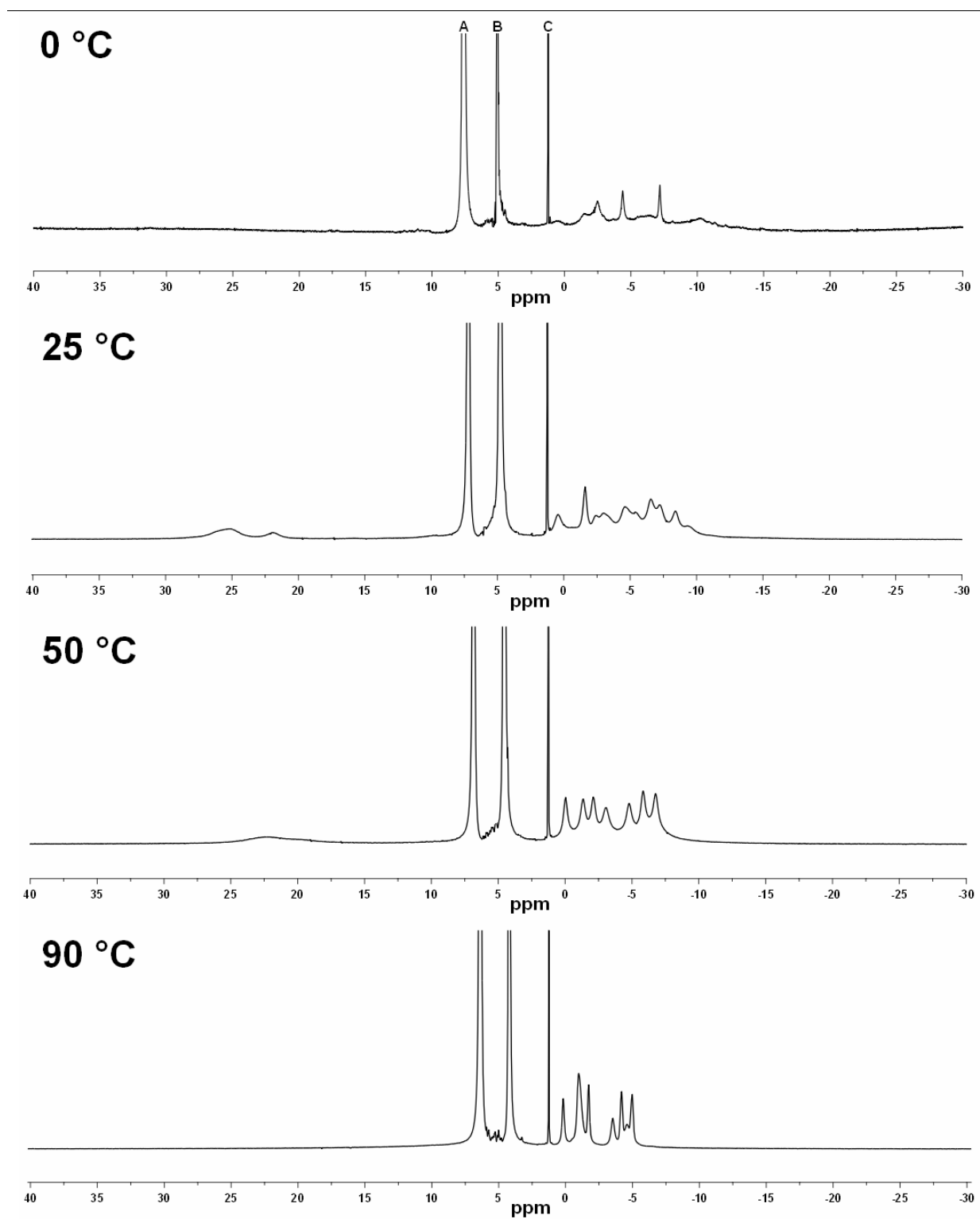
$$[\text{H}_5\text{L}] = \frac{1}{\frac{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5}{[\text{H}]^5} + \frac{K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5}{[\text{H}]^4} + \frac{K_3 \cdot K_4 \cdot K_5}{[\text{H}]^3} + \frac{K_4 \cdot K_5}{[\text{H}]^2} + \frac{K_5}{[\text{H}]} + 1 + \frac{[\text{H}]}{K_6}}$$

$$[\text{H}_5\text{L}] = \frac{1}{\frac{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5 \cdot K_6}{[\text{H}]^6} + \frac{K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5 \cdot K_6}{[\text{H}]^5} + \frac{K_3 \cdot K_4 \cdot K_5 \cdot K_6}{[\text{H}]^4} + \frac{K_4 \cdot K_5 \cdot K_6}{[\text{H}]^3} + \frac{K_5 \cdot K_6}{[\text{H}]^2} + \frac{K_6}{[\text{H}]} + 1}$$

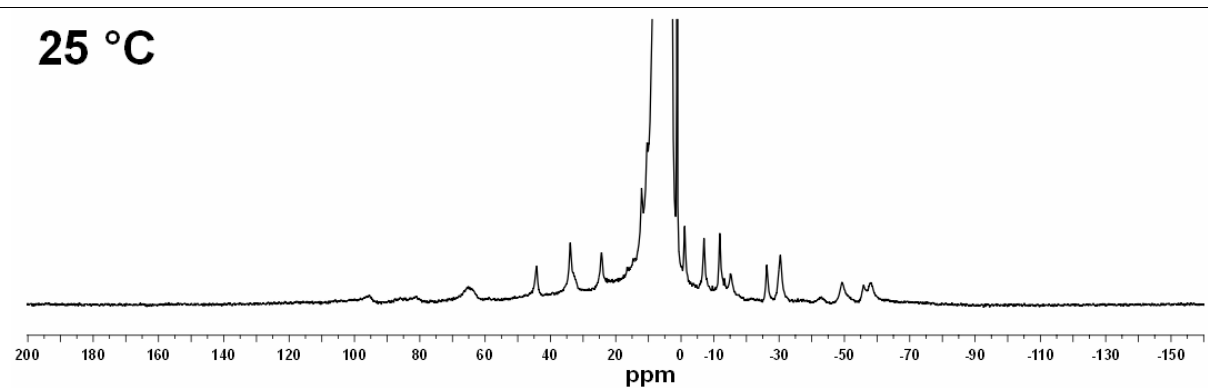
**Příloha 3:**  $^1\text{H}$  NMR spektra ytterbitých a europitých komplexů ligandů  $\text{H}_3\text{L}^1$ ,  $\text{H}_3\text{L}^1\text{Me}$  a  $\text{H}_3\text{L}^12\text{Me}$  při různých teplotách.



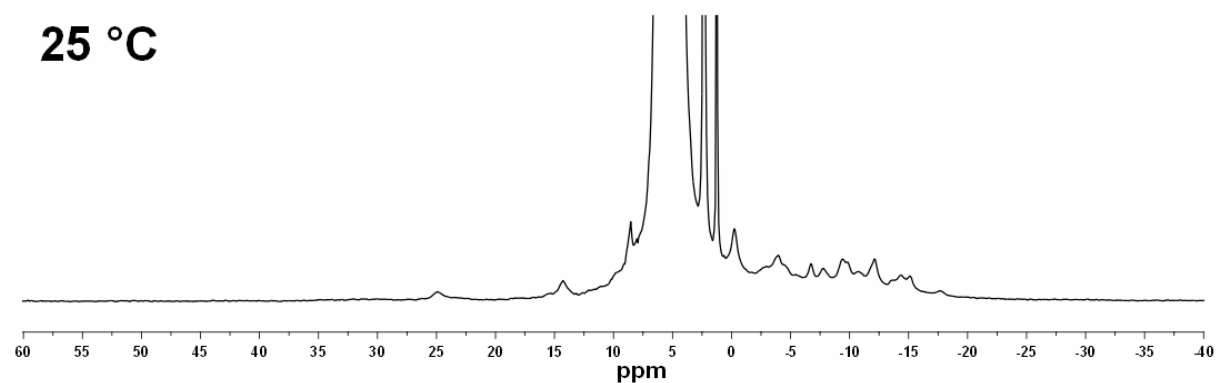
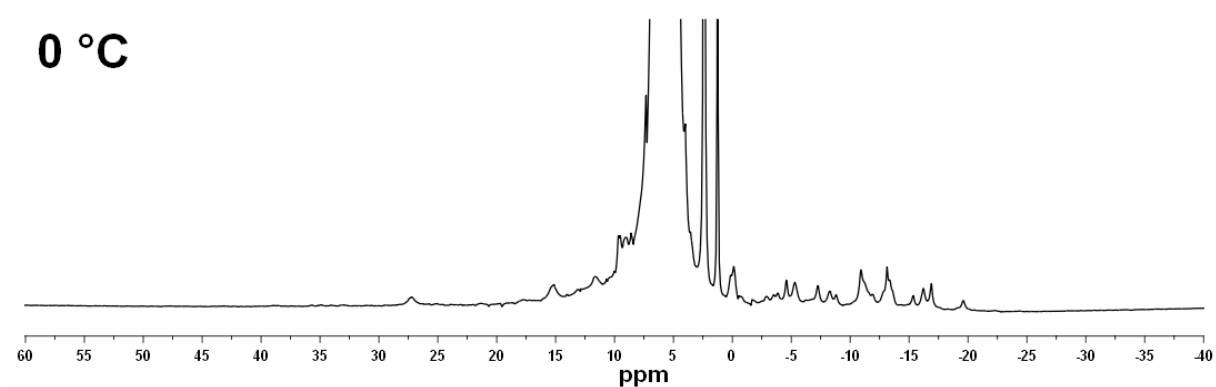
**Obrázek 36:**  $^1\text{H}$  NMR spektra komplexu  $\text{Yb-L}^1$  (0,1M roztok) při teplotě 0, 25, 50 a 90 °C,  $B_0 = 400$  nebo 300 MHz,  $\text{pD} = 8,5$ . Spektra byla měřena v  $\text{D}_2\text{O}$ . A: HDO v roztoku, B: HDO v inertní kyvetě, C:  $t\text{-BuOH}$  v inertní kyvetě.



**Obrázek 37:**  $^1\text{H}$  NMR spektra komplexu  $\text{Eu-L}^1$  (0,1M roztok) při teplotě 0, 25, 50 a 90 °C,  $B_0 = 400$  nebo 300 MHz,  $\text{pD} = 9$ . Spektra byla měřena v  $\text{D}_2\text{O}$ . A: HDO v roztoku, B: HDO v inertní kyvetě, C:  $t\text{-BuOH}$  v inertní kyvetě.



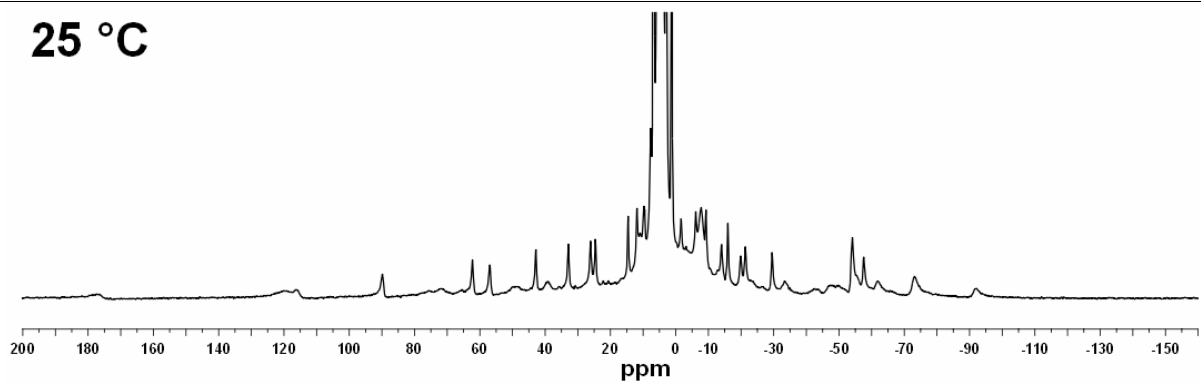
**Obrázek 38:**  $^1\text{H}$  NMR spektrum komplexu  $\text{Yb-L}^1\text{Me}$  (0,05M roztok ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  1:10,  $\text{pH} = 8,35$ ) při teplotě 25 °C,  $B_0 = 300$  MHz (nejintenzivnější signál odpovídá  $\text{H}_2\text{O}$  v roztoku).



**Obrázek 39:**  $^1\text{H}$  NMR spektra komplexu  $\text{Eu-L}^1\text{Me}$  (0,05M roztok ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  1:10,  $\text{pH} = 8,16$ ) při teplotě 0 a 25 °C,  $B_0 = 400$  nebo 300 MHz (nejintenzivnější signál odpovídá  $\text{H}_2\text{O}$  v roztoku).

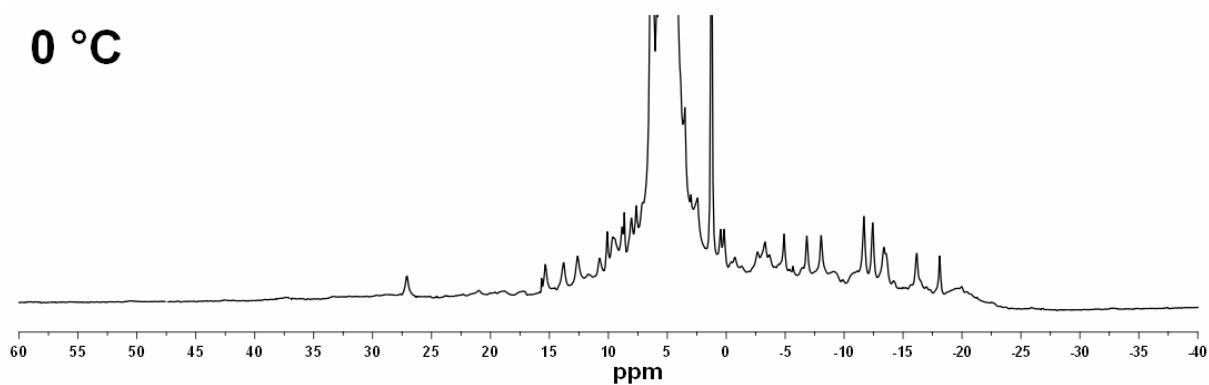
---

25 °C

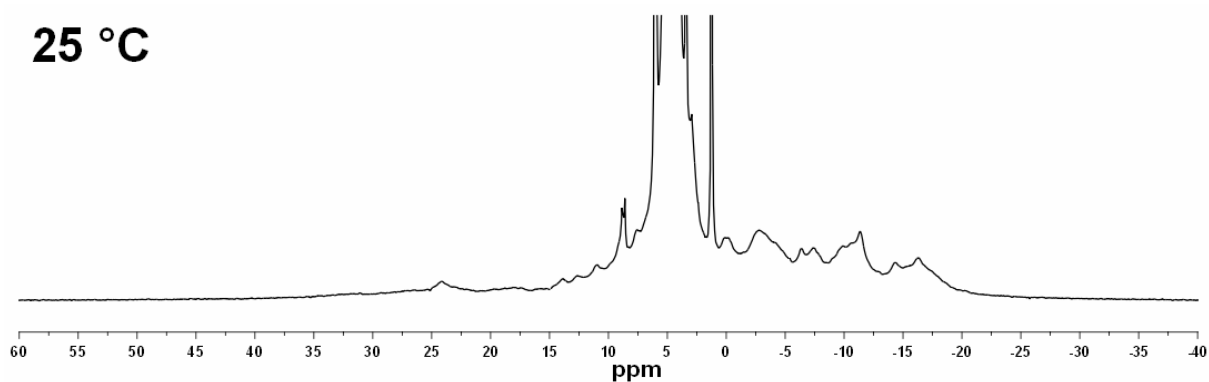


**Obrázek 40:**  $^1\text{H}$  NMR spektrum komplexu Yb-L<sup>1</sup>2Me (0,05M roztok ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  1:10, pH = 10,1) při teplotě 25 °C,  $B_0 = 300$  MHz (nejintenzivnější signál odpovídá  $\text{H}_2\text{O}$  v roztoku).

0 °C



25 °C



**Obrázek 41:**  $^1\text{H}$  NMR spektra komplexu Eu-L<sup>1</sup>2Me (0,05m roztok ve směsi  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  1:10, pH = 10,1) při teplotě 0 a 25 °C,  $B_0 = 400$  nebo 300 MHz (nejintenzivnější signál odpovídá  $\text{H}_2\text{O}$  v roztoku).

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AcOH	kyselina octová
B.M.	Bohrův magneton
BMS	Bulk Magnetic Susceptibility Shift
Boc	<i>t</i> -butyloxykarbonyl
CA	Contrast Agent (kontrastní látka)
CEST	Chemical Exchange Saturation Transfer
COSY	Correlation Spectroscopy
CT	Computed Tomography (počítačová tomografie)
d2	second delay, relaxation delay (druhá relaxační perioda)
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DO2A	1,7-bis(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan
DO3A	1,4,7-tris(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan
DOTA	1,4,7-tetrakis(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan
DOTAM	1,4,7,10-tetrakis(karbamoylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan
DTPA	kyselina diethylenetriaminpentaoctová
EPR	Electron Paramagnetic Resonance (elektronová paramagnetická rezonance)
Et	ethyl
EXSY	Exchange Spectroscopy
FID	Free Induction Decay
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High-Performace Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IPAV	<i>i</i> -propanol/konc. aq. amoniak/voda ( <i>i</i> -PrOH/konc. aq. NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O)
IPOV	<i>i</i> -propanol/kyselina octová/voda ( <i>i</i> -PrOH/CH <sub>3</sub> COOH/H <sub>2</sub> O)
IS	Inner Sphere (vnitřní koordinační sféra)
LIS	Lanthanide Induced Shift (lanthanoidy indukovaný posun)
Me	methyl
MeCN	acetonitril
MRI	Magnetic Resonance Imaging (tomografie magnetické rezonance)
MS	Mass Spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
MS-ESI	Mass Spectrometry-Electron Spray Ionization (hmotnostní spektrometrie-ionizace elektrosprejem)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Nukleární Magnetická Rezonance)
OS	Outer Sphere (vnější koordinační sféra)
PET	Positron Emission Tomography (Pozitronová Emisní Tomografie)
Ph	fenyl

Pr	propyl
$R_f$	retenční faktor
RT	Room Temperature (laboratorní teplota)
SA	Square Antiprism (čtvercové antiprizma)
satdly	presaturation delay (délka presaturačního pulzu)
satpwr	saturation power level (intenzita presaturačního pulzu)
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography (jednofotonová počítačová emisní tomografie)
SS	Second Sphere (druhá koordinační sféra)
TBAB	bromid tetrabutylamonný
<i>t</i> -Bu <sub>3</sub> DO3A	1,4,7-tris-( <i>t</i> -butylkarboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan
THF	tetrahydrofuran
TLC	Thin Layer Chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
TMS	tetramethylsilan
TSA	Twisted Square Antiprism (zkřížené čtvercové antiprizma)
Z-Cl	benzyloxykarbonylchlorid (benzyl chloroformiát)
TR	Repetition Time (repetiční čas)
TE	Echo Time (echo čas)

## 8 LITERATURA

- 
- [1] C. E. Dykstra, W. M. Davis (Editor), *Physical Chemistry: A Modern Introduction (2nd Edition)*, CRC Press, Taylor & Francis Group, USA **2012**
- [2] E. D. Becker, *High Resolution NMR: Theory and Chemical Applications (3rd Edition)*, Academic Press, USA **2000**
- [3] W. G. Proctor, F. C. Yu, *Phys. Rev.*, **1950**, *77*, 717
- [4] T. Engel, *Quantum Chemistry and Spectroscopy*, Benjamin Cummings, **2005**
- [5] P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry 8<sup>th</sup> edition*, Oxford University Press, Oxford **2006**
- [6] N. E. Jacobsen, *NMR Spectroscopy Explained*, John Wiley & Sons, New Jersey **2007**
- [7] W. R. Hendee, E. R. Ritenour, *Medical Imaging Physics (4th Edition)*, Wiley-LISS. Inc., New York **2002**
- [8] A. D. Bain, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2003**, *43*, 63–103
- [9] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, I. Lukeš, *Dalton Trans.*, **2008**, *23*, 3027–3047
- [10] C. F. G. C. Geraldes, S. Laurent, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2009**, *4*, 1–23
- [11] A. E. Merbach, É. Tóth (Editor), *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Chichester **2001**
- [12] J. Kotek, I. Lukeš, *Chem. Listy*, **2010**, *104*, 1163–1174
- [13] physiology-physics, [online], [cit. 2012-11-03],  
<<http://physiology-physics.blogspot.com/2010/07/relaxation-in-nuclear-microcosm.html>>
- [14] J. A. Peters, J. Huskens, D. J. Raber, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1996**, *28*, 283–350
- [15] R. Ranganathan, N. Raju, H. Fan, X. Zhang, M. Tweedle, J. Desreux, V. Jacques, *Inorg. Chem.*, **2002**, *41*, 6856–6866
- [16] W. P. Cacheris, S. C. Quay, S. M. Rocklage, *Magn. Reson. Imaging*, **1990**, *8*, 467–481
- [17] S. Aime, P. Caravan, *J. Magn. Reson. Imaging*, **2009**, *30*, 1259–1267
- [18] P. Carava, J. Ellison, T. McMurry, R. Lauffer, *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2293–2352
- [19] H. M. McConnell, D. D. Thompson, *J. Chem. Phys.*, **1957**, *26*, 958–959
- [20] A. D. Sherry, M. Woods, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2008**, *10*, 391–411
- [21] R. M. Henkelman, G. J. Stanisz, S. J. Graham, *NMR Biomed.*, **2001**, *14*, 57–64
- [22] K. M. Ward, A. H. Altras, R. S. Balaban, *J. Magn. Reson.*, **2000**, *143*, 79–87
- [23] K. M. Ward, R. S. Balaban, *Magn. Res. Med.*, **2000**, *44*, 799–802
- [24] E. Terreno, D. D. Castelli, G. Cravotto, L. Milone, S. Aime, *Invest. Radiol.*, **2004**, *39*, 235–243
- [25] S. Zhang, C. Malloy, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17572–17573
- [26] S. Aime, D. D. Castelli, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 4334–4336
- [27] S. Zhang, P. Winter, K. Wu, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 1517–1518
- [28] S. Aime, A. Barge, M. Botta, A. S. De Sousa, D. Parker, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**,



- [29] M. Woods, D. E. Woessner, A. D. Sherry, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 500–511
- [30] S. Aime, D. D. Castelli, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 5513–5515
- [31] S. Aime, A. Barge, J. I. Bruce, M. Botta, J. A. Howard, J. M. Moloney, D. Parker, A. S. de Sousa, M. Woods, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 5762–5771
- [32] S. Zhang, P. Winter, K. Wu, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 4284–4290
- [33] M. Woods, A. Pasha, P. Zhao, G. Tircso, S. Chowdhury, G. Kiefer, D. E. Woessner, A. D. Sherry, *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 6759–6764
- [34] M. Woods, D. E. Woessner, P. Zhao, A. Pasha, M. Y. Yang, Ch. H. Huang, O. Vasalitiy, J. R. Morrow, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 10155–10162
- [35] Ch. H. Huang, J. R. Morrow, *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 7237–7243
- [36] Ch. H. Huang, J. R. Morrow, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 4206–4207
- [37] B. Yoo, M. D. Pagel, *Bioconjugate Chem.*, **2007**, 18, 903–911
- [38] F. Wojciechowski, M. Suchy, A. X. Li, H. A. Azab, R. Bartha, R. H. E. Hudson, *Bioconjugate Chem.*, **2007**, 18, 1625–1636
- [39] S. J. Ratnakar, M. Woods, A. J. M. Lubag, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 6–7
- [40] D. H. Powell, O. M. Ni Dhubhghail, D. Pubanz, L. Helm, Y. S. Lebedev, W. Schlaepfer, A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 9333–9346
- [41] K. Micskei, L. Helm, E. Brücker, A. E. Merbach, *Inorg. Chem.*, **1993**, 31, 3844–3850
- [42] D. F. Evans, *J. Chem. Soc.*, **1959**, 2003
- [43] D. M. Corsi, C. Platas-Iglesias, H. van Bekkum, J. A. Peters, *Magn. Reson. Chem.*, **2001**, 39, 723–726
- [44] S. Aime, M. Botta, M. Fasano, M. P. M. Marques, C. F. G. C. Geraldès, D. Pubanz, A. E. Merbach, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 2059–2068
- [45] S. Aime, M. Botta, G. Ermondi, *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 4291–4299
- [46] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed., Pergamon Press, Oxford **1988**
- [47] *SIR92 – A Program for Automatic Solution of Crystal Structures by Direct Methods*. A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, M. C. Burla, G. Polidori, M. Camalli, *J. Appl. Cryst.*, **1994**, 27, 435
- [48] G. M. Hledrick, *SHELXL-97, A computer program for refinement of crystal structures*, University of Göttingen, Göttingen **1997**
- [49] A. L. Spek, *Platon – A Multipurpose Crystallographic Tool*, Utrecht University, Utrecht **2005**
- [50] M. Polášek, *Diplomová práce, PřFUK v Praze, Praha* **2004**
- [51] (a) B. K. Das, N. Shibata, Y. Takeuchi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 197–206  
(b) N. Cesari, C. Biancalani, C. Vergelli, V. Piaz, A. Graziano, P. Biagini, C. Ghelardini, N. Galeotti, M. P. Giovannoni, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 7826–7835

- 
- <sup>(c)</sup>J. Jaśkowska, P. Kowalski, *J. Heterocycl. Chem.*, **2008**, *45*, 1371–1375
- [52] A. K. Mishra, J.-F. Chatal, *New J. Chem.*, **2001**, *25*, 336–339
- [53] A. El Alaoui, F. Schmidt, M. Amessou, M. Sarr, D. Decaudin, J.-C. Florent, L. Johanès, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 6469–6472
- [54] Z. Kovacs, A.D. Sherry, *Synthesis*, **1997**, 759–763
- [55] M. Kývala, I. Lukeš, International Conference Chemometrics 95, str. 63, Pardubice, Česká republika, **1995**. Plná verze programu: <http://web.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html>.
- [56] S. Zhang, L. Michaudet, S. Burgess, A. D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 1919–1921.
- [57] *User Guide: Liquids NMR, Varian NMR Spectrometer Systems With VNMR 6.1C Software*, Varian, Inc., USA **2001**
- [58] G. Anderegg, F. Arnaud-Neu, R. Delgado, J. Felcman, K. Popov, *Pure Appl. Chem.*, **2005**, *77*, 1445–1495
- [59] K. Kumar, C. A. Chang, L. C. Francesconi, D. D. Dischino, M. F. Malley, J. Z. Gougoutas, M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, **1994**, *33*, 3567–3575
- [60] W. P. Cacheris, S. K. Nickle, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.*, **1987**, *26*, 958–960
- [61] T. Vitha, V. Kubíček, J. Kotek, P. Hermann, L. V. Elst, R. N. Muller, I. Lukeš, J. A. Peters, *Dalton Trans.*, **2009**, 3204–3214
- [62] J. Rudovský, P. Cígler, J. Kotek, P. Hermann, P. Vojtíšek, I. Lukeš, J. A. Peters, L. V. Elst, R. N. Muller, *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 2373–2384
- [63] G. B. Giovenzana, R. Negri, G. A. Rolla, L. Tei, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 2035–2039
- [64] P. Caravan, A. V. Astashkin, A. M. Raitsimiring, *Inorg. Chem.*, **2003**, *42*, 3972–3974
- [65] A. Borel, L. Helm, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 2035–2039
- [66] S. Aime, M. Botta, S. G. Crich, G. Giovenzana, R. Pagliarin, M. Sisti, E. Terreno, *Magn. Reson. Chem.*, **1998**, *36*, 200–208

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala těm, kteří jakkoliv přispěli k sepsání této práce. Děkuji všem svým učitelům chemie, kteří ve mně probudili (a poté intenzivně podporovali) můj zájem o chemii. Velké díky patří mým rodičům, kteří se nezalekli mé potenciální „chemické“ budoucnosti a po celou dobu studia mě podporovali všemi možnými (i zdánlivě nemožnými) způsoby.

Děkuji svému školiteli Honzovi Kotkovi za jeho nápady, připomínky a rady (jak chemické, tak typografické), kterými se zasloužil o úspěšné zahájení, pokračování a nyní i dokončení této práce. Děkuji mu za pomoc se zpracováním nejrozumnějších dat a hlavně za trpělivost, se kterou si nakonec vždy poslechl i to, co nechtěl slyšet.

Poděkování si zaslouží všichni kolegové z našeho „malého“ a „velkého labu“, kteří svým přístupem a nadšením vytvářeli velmi podnětnou a motivující pracovní atmosféru. Speciální dík patří nH (čti: nejlepšímu Honzovi), který se svým osobitým přístupem ke všem mým (s prací nesouvisejícím) nápadům staral o zachování mého duševního zdraví. Velké díky patří panu Mírovi za pomoc při práci s HPLC, za rady z oblasti organické syntézy a ochotu pomoci, kdykoliv bylo třeba.

Děkuji Ivaně Císařové za změření rentgenových struktur, Janě Havlíčkové za provedení potenciometrických titrací, Ivaně Strašlipkové za provedení elementárních analýz, panu Mírovi, Vojtovi a nH za měření hmotnostních spekter, Plutovi a Zdeňkovi Tošnerovi za mnoho užitečných rad a nápadů při měření speciálních NMR experimentů, Sandrovi za naměření některých NMR spekter na „šestistovce“, Danovi Jirákovvi z IKEM za obrázky z MRI scanneru a samozřejmě prof. Petru Štěpničkovi za ochotu tuto práci oponovat.

Na závěr bych chtěla poděkovat Petrovi za podporu, trpělivost a jeho každodenní dávku „motivačního rýpání“.